

**UNTERSUCHUNGEN ZUR AKTIVITÄT DES sis - ONKOGENS
IN MENSCHLICHEN SARKOMEN**

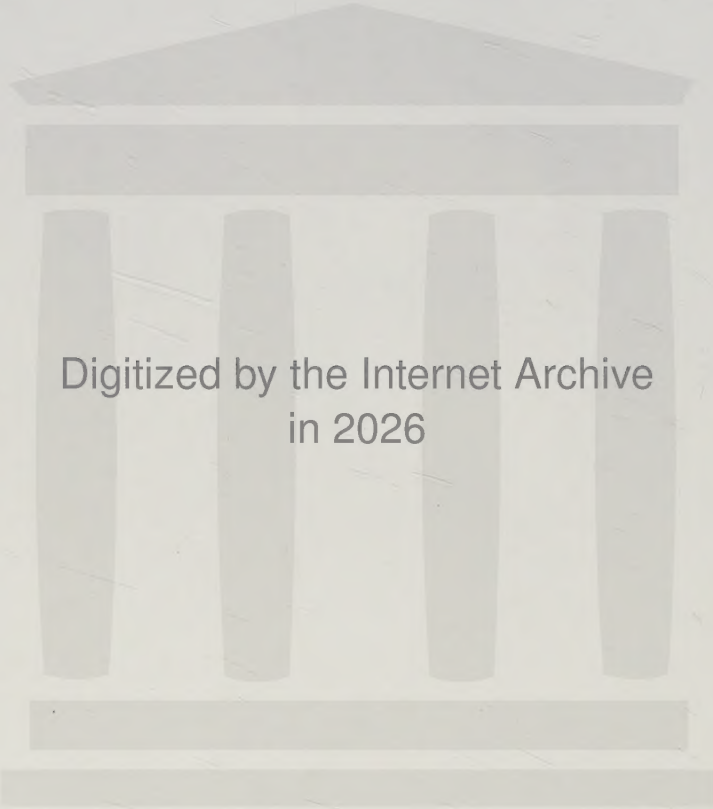
RAINER BRACHMANN

1987

Disbui. München

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554822_0074

Aus dem Max von Pettenkofer Institut für Hygiene und
medizinische Mikrobiologie der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. F. Deinhardt

Untersuchungen zur Aktivität des sis-Onkogens
in menschlichen Sarkomen

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Rainer Brachmann
aus
Kaufbeuren

Jahr
1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. K. von der Helm

Mitberichterstatter: 1. Prof. Dr. F. Deinhardt

2. Prof. Dr. U. Jehn

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 30.7.87

DANKSAGUNG

Herrn Priv. Doz. Dr. Klaus von der Helm danke ich für die Überlassung des Themas, für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz und im besonderen für die praktische und theoretische Betreuung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Friedrich Deinhardt danke ich für die stete Unterstützung der Arbeit sowie für sein Interesse.

Ganz besonders danken möchte ich Dietlinde Rose, Claus Fahrer, Dr. Martin Lipp und Dr. Richard Ostermayr, die durch unzählige wertvolle Hinweise und Ratschläge wesentlich zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	6
1.1. <u>RNA-Tumoviren</u>	6
1.2. <u>Die zellulären Proto-Onkogene (c-onc)</u>	8
1.3. <u>Die physiologische Funktion der Proto-Onkogene</u>	10
1.4. <u>Besitzen zelluläre Onkogene die Fähigkeit zur Tumorinduktion ?</u>	11
1.5. <u>Das c-sis-Gen und der Wachstumsfaktor PDGF (Platelet Derived Growth Factor)</u>	14
1.6. <u>Das c-fos-Gen</u>	19
1.7. <u>Das c-myc-Gen</u>	21
1.8. <u>Zusammenhänge zwischen c-sis, c-fos, c-myc und deren Produkten</u>	22
1.9. <u>Fragestellungen und Ziele dieser Arbeit</u>	23

	Seite
2. MATERIALIEN UND METHODEN	24
2.1. <u>Zellen</u>	24
2.2. <u>Biopsien</u>	25
2.3. <u>Gewebekulturen</u>	25
2.4. <u>RNA</u>	26
2.4.1. RNA-Präparation	27
2.4.2. Oligo(dT)-Cellulose-Chromatographie	28
2.4.3. Glyoxal-Agarosegele und Formaldehyd- Agarosegele	29
2.4.4. Northern Blot	31
2.5. <u>DNA</u>	31
2.5.1. DNA-Präparation	31
2.5.2. DNA-Spaltung durch Restriktionsenzyme	33

Seite

2.5.3. Elektrophorese und Southern Blot	34
2.6. <u>Hybridisierung</u>	35
2.6.1. Verwendete Proben und deren Isolation	35
2.6.2. Nick Translation	36
2.6.3. Hybridisierung der RNA	38
2.6.4. Hybridisierung der DNA	38
3. ERGEBNISSE	39
3.1. <u>Untersuchungen zur Expression des</u> <u>c-sis-, c-fos- und c-myc-Gens</u>	39
3.1.1. Untersuchungen in Zelllinien von Osteosarkomen	39
3.1.1.1. Expression des c- <u>sis</u> -Gens	41
3.1.1.2. Expression des c- <u>fos</u> -Gens	42

	Seite
3.1.1.3. Expression des c- <u>myc</u> -Gens	43
3.1.2. Untersuchungen in Tumorbiopsien von Fibrosarkomen und einem Lymphom	44
3.1.2.1. Expression des c- <u>sis</u> -Gens	45
3.1.2.2. Expression des c- <u>fos</u> -Gens	46
3.1.2.3. Expression des c- <u>myc</u> -Gens	47
3.1.3. Zusammenfassung der c- <u>sis</u> -, c- <u>fos</u> - und c- <u>myc</u> -Expression für jede Tumor- zelllinie und Tumorbiopsie	48
3.2. <u>Untersuchungen zur Organisation des c-sis-, c-fos- und c-myc-Gens in Tumorzelllinien und Tumorbiopsien</u>	49
3.2.1. Organisation des c- <u>sis</u> -Gens	51
3.2.2. Organisation des c- <u>fos</u> -Gens	55
3.2.3. Organisation des c- <u>myc</u> -Gens	59

4. DISKUSSION	63
4.1. <u>Expression des c-sis-, c-fos- und c-myc-Gens</u> <u>in Tumorzelllinien und Tumorbiopsien</u>	63
4.2. <u>Organisation des c-sis-, c-fos- und c-myc-Gens</u> <u>in Tumorzelllinien und Tumorbiopsien</u>	71
5. ZUSAMMENFASSUNG	73
6. LITERATURVERZEICHNIS	75



1. EINLEITUNG

1.1. RNA-Tumoviren

Die Erforschung der bösartigen Neoplasien spielt in der modernen Medizin eine zentrale Rolle. Als exogene Noxen wurden chemische Agentien, ionisierende Strahlen und Tumoviren gefunden. Tumoviren können aus primären und sekundären Tumoren vieler Tierarten isoliert werden und rufen nach Inokulation in gesunde Tiere der entsprechenden Spezies wieder Sarkome, Karzinome oder Leukämien hervor. Mit den isolierten Viren lassen sich auch Kulturzellen durch in-vitro-Infektion transformieren.

Die onkogenen Viren werden grundsätzlich nach der Nukleinsäure des Virusgenoms in DNA- und RNA-Tumoviren eingeteilt. Obwohl RNA-Tumoviren in der Tierwelt vielfältige Tumoren hervorrufen, schienen sie bis vor kurzem in der Humanmedizin ohne klinische Bedeutung zu sein, bis in jüngster Zeit RNA-Tumoviren in den Lymphozyten von Patienten mit T-Zell-Leukämien und T-Zell-Lymphomen nachgewiesen werden konnten (Poiesz et al., 1980, Hinuma et al., 1981). Die wesentlichere Bedeutung kommt den RNA-Tumoviren jedoch aufgrund der Tatsache zu, daß durch ihr wissenschaftliches Studium ein leicht reproduzierbares Modell für die Tumorgenese entstand, das uns heute zu Erkenntnissen geführt hat, die weit über ihre Bedeutung als mögliche Tumorursache hinausgehen. Um diese Erkenntnisse zu skizzieren und damit auch die Überlegungen zu erläutern, die zu der vorliegenden Arbeit führten, sei die Entwicklung dieses Forschungszweiges kurz dargestellt.

Schon Anfang dieses Jahrhunderts gelang es Ellermann und Bang (1908), sowie Rous (1911) mit zellfrei filtrierten Extrakten aus Sarkomen, beziehungsweise Leukämiezellen von Hühnern bei gesunden Tieren Tumoren zu erzeugen. Zögernd folgte die Entdeckung einiger weiterer RNA-Tumroviren und erst vier Jahrzehnte später ergab sich ein entscheidender Ansatzpunkt für die wissenschaftliche Erforschung der Tumroviren durch die 1953 von Lwoff geäußerte Vorstellung, daß eine virale Information in das Genom der Gastzelle integriert, also vererbbarer, zellulärer Genombestandteil werden kann. Die exemplarischen Versuche am Rous-Sarcoma-Virus von Rubin und Temin führten nach 1959 zu der Provirus-Hypothese, die eine Virusvermehrung über ein DNA-Zwischenprodukt postulierte. Sie schlossen dies aus den Tatsachen, daß einerseits infizierte Zellen virus-induzierte Eigenschaften vererben, andererseits durch Actinomycin, einem Inhibitor der Transkription von DNA zu RNA die Virusproduktion deutlich unterdrückt werden konnte (Rubin und Temin, 1959, Temin, 1963, 1964a,b). Die Provirus-Hypothese widersprach jedoch dem zentralen Dogma der Molekularbiologie, das den ausschließlichen Informationsfluß von der DNA über RNA zum Protein forderte (Crick, 1970).

1970 konnte dieser Widerspruch von Temin und Baltimore durch die Entdeckung der Reversen Transkriptase gelöst werden. Dieses Enzym ist in der Lage, die virale RNA in eine komplementäre DNA umzuschreiben (Temin und Mizutani, 1970, Baltimore, 1970).

Durch die intensive Forschung der folgenden Jahre kennt man heute den prinzipiellen Aufbau des Genoms der RNA-Tumroviren, die zu der Familie der Retroviren gezählt werden (Dalton et al., 1974). Es enthält im Prinzip vier Gene. Drei davon kodieren für die zur Replikation des

Virus notwendigen Strukturproteine. Das gag-Gen enthält die Information für die Kapsidproteine, das pol-Gen für die Reverse Transkriptase und das env-Gen für die Glykoproteine der äußeren Hülle. Die Information für die viruskodierte Proteinase ist entweder am 3'-Ende des gag-, oder am 5'-Ende des pol-Gens enthalten (von der Helm, 1977). Das vierte prinzipielle Gen ist das Onkogen. Es ist für die Transformation der Wirtszelle verantwortlich (Collett et al., 1978, Oppermann et al., 1979). Nicht alle RNA-Tumoviren besitzen das oben beschriebene Muster eines vollständigen Genoms. Die Mehrzahl der Onkogen tragenden Tumoviren hat eine Deletion in den Replikationsgenen (gag, pol und env). Diese Viren können Zellen transformieren, benötigen aber zu ihrer Replikation die Koinfektion eines sogenannten Helfer-Virus, das die Replikationsgene gag, pol und env besitzt, nicht aber das virale Onkogen. Über 25 verschiedene virale Onkogene sind heute bekannt, die jeweils spezifische Tumortypen verursachen (Bishop, 1985).

1.2. Die zellulären Proto-Onkogene (c-onc)

Die Tatsache, daß die Oncornavirusreplikation über eine im Wirtszellkern integrierte DNA-Zwischenstufe verläuft und die Beobachtung, daß aus Zellen von Mäusen mit hoher Leukämierate spontan C-Typ-Partikel freigesetzt werden, brachten Huebner und Todaro 1969 zur Formulierung ihrer Onkogen-Hypothese. Sie besagt, daß die genetische Information der C-Typ-Partikel Teil der zellulären Chromosomen ist. Diese Information wird normalerweise durch Repressoren unterdrückt (Jacob und Monod, 1961). Durch Karzinogene kann möglicherweise diese Kontrolle aufgehoben werden und zur Transformation der Zelle führen.

Bei der Überprüfung dieser These, die man zunächst mit Vogelzellen durchführte, stellte sich heraus, daß die Onkogene der Viren (v-onc) nicht nur in infizierten Zellen zu finden, sondern daß auch in uninfizierten Zellen DNA-Sequenzen (c-onc) vorhanden waren, die mit den viralen Onkogenen teilweise identisch oder sehr nahe verwandt sind (Stehelin et al., 1976). Es folgte der Nachweis dieser Gene (c-onc) in Zellen von verschiedenen Säugetieren und des Menschen (Spector et al., 1978, Bishop und Varmus, 1982). Inzwischen konnten zu den viralen Onkogenen v-src, v-abl, v-ras und v-myc homologe DNA-Sequenzen sogar in Insekten (*Drosophila*) gefunden werden (Shilo und Weinberg, 1981). In Hefezellen sind DNA-Sequenzen nachweisbar, die mit dem v-ras-Gen verwandt sind (Marx, 1984).

Schon nach den ersten Ergebnissen wurde klar, daß es sich bei den gefundenen Genen keineswegs um integrierte Provirus-DNA, sondern um ureigene Zellgene handeln mußte. Im Laufe der Evolution waren vermutlich die zellulären Genkopien (c-onc) in die Genome von Helfer-ähnlichen Protoviren transferiert worden. Folgende Gründe sprechen dafür: Die zellulären Gene, heute Proto-Onkogene (c-onc) genannt, sind innerhalb einer Spezies immer in gleicher Kopienanzahl und bis auf polymorphische Ausnahmen immer in gleicher Chromosomenposition im Zellkern vorhanden, im Gegensatz zu den wahllosen Integrationsorten einer Virus-DNA. Die zellulären Proto-Onkogene sind über große Abschnitte der Evolution konserviert geblieben und haben die typische Exon-/Intron-Organisation, die ein charakteristisches Merkmal aller eukaryotischen Gene sind. Virale Onkogene dagegen bestehen nur aus "Exons" (Bishop, 1983a).

Für alle anfangs gefundenen viralen Onkogene (v-onc) konnte bis jetzt

immer das zugehörige ursprüngliche zelluläre Proto-Onkogen (c-onc) in menschlichen Zellen nachgewiesen werden. Die chromosomale Lokalisierung der c-onc-Gene ist weitgehend bekannt. Sie sind wie andere Genfamilien ohne erkennbare Gesetzmäßigkeiten im Chromosomensatz des Menschen verteilt. Auch die Transkription der Proto-Onkogene verläuft genauso wie die anderer Gene.

Welche Funktion haben diese zellulären Proto-Onkogene (c-onc), die in jeder gesunden Zelle vorhanden sind, die trotz Sequenzhomologie zu den tumorinduzierenden viralen Onkogenen per se keine Transformation auslösen und die sogar für die Zelle essentiell und vorteilhaft sein müssen, da sie im Laufe der Evolution ausgezeichnet konserviert wurden? Gibt es möglicherweise Umstände, unter denen die Proto-Onkogene tatsächlich tumorinduzierende Aktivitäten entfalten können? Bis jetzt lassen sich dazu erst Vermutungen äußern.

1.3. Die physiologische Funktion der Proto-Onkogene

Aufgrund der bisherigen Forschungsergebnisse wird allgemein angenommen, daß die Proto-Onkogene eine Rolle bei Wachstum und Differenzierung der Zellen spielen. Es gibt Beispiele, wie Proto-Onkogene nur in bestimmten Geweben und Entwicklungsstufen exprimiert werden (Müller und Verma, 1984). Eines davon ist die Expression der mRNA von c-myb, die man in bestimmten hämatopoetischen Zellen findet (Chen, 1980, Gonda et al., 1982, Westin et al., 1982a). Das c-fos-Gen ist in Knochengewebe von neugeborenen, nicht aber erwachsenen Mäusen angeschaltet (Müller et al., 1982). Der Rückschluß von den viralen auf die zellulären Onkogene weist ebenfalls in diese Richtung, denn die RNA-Tumerviren infizieren

selektiv bestimmte Gewebe und greifen in den Prozeß der normalen Zellproliferation und Zelldifferenzierung ein (Bishop, 1983b).

1.4. Besitzen zelluläre Onkogene die Fähigkeit zur Tumorinduktion?

Nach wie vor gibt es keinen endgültigen Beweis, daß aktivierte Proto-Onkogene als Krebsursache ausreichend oder notwendig sind (Duesberg, 1985). Eine große Zahl von Hinweisen macht jedoch diese Hypothese sehr wahrscheinlich. Dabei zeichnen sich zwei prinzipielle Möglichkeiten ab, wie an und für sich gutartige und für das Zellwachstum wichtige Gene die Fähigkeit zur onkogenen Transformation erlangen könnten: die "Quantitative oder Dosistheorie" und die "Qualitative oder Mutationstheorie".

Die erste Hypothese führt eine mögliche onkogen bedingte Transformation der Zelle darauf zurück, daß das Gen in seiner Struktur zwar unverändert ist, doch sein eigentlich physiologisches und funktionell sinnvolles Genprodukt in derart großer Anzahl hergestellt wird, daß die Zelle dadurch in einer bis jetzt noch unbekannten Weise überlastet wird und maligne entartet. Als Ursache für die zu hohe Proteinproduktion könnte die Kontrolle der Genregulation verändert sein, möglicherweise durch Modifikation der Steuersequenzen oder durch die Insertion eines stärkeren Promotors. Weiterhin kann die unphysiologisch hohe Konzentration eines Proteins auch auf die Amplifikation des entsprechenden Proto-Onkogens zurückzuführen sein. Die Regulation des einzelnen Gens ist zwar qualitativ intakt, doch durch die Tatsache, daß es multiple vorhanden ist, ergibt sich ebenfalls eine Überproduktion.

Die zweite Hypothese, die Mutationstheorie geht davon aus, daß das Proto-Onkogen selbst in seiner Struktur verändert ist. Als Folge wird ein verändertes Genprodukt in normaler Menge produziert, das zum Beispiel eine andere Funktion erlangt hat oder nicht den Regulationsmechanismen des nicht-mutierten Proteins unterworfen ist.

Schließlich läßt sich als Synthese der beiden Hypothesen vorstellen, daß die Produkte eines Gens verändert sind und diese aufgrund einer unphysiologischen Regulation vermehrt produziert werden.

Für beide Möglichkeiten gibt es Beispiele, ohne daß sich bis jetzt endgültig Schlußfolgerungen ziehen lassen. In der menschlichen promyelozytischen Leukämie-Zelllinie HL60 wurde eine zehnfache Amplifikation des c-myc-Gens festgestellt (Collins und Grondine, 1982, Dalla-Favera et al., 1982a) und damit verbunden ein Anstieg des myc-Produktes (Westin et al., 1982b). Der gleiche Nachweis gelang für die menschliche neuroektodermale Tumorzelllinie COL0320 (Alitalo et al., 1983). Andererseits konnte bei den Zelllinien EJ und T24 eines menschlichen Blasenkarzinoms eine Punktmutation als Ursache eines veränderten, aber nicht stärker exprimierten Proteins ausgemacht werden (Tabin et al., 1982, Reddy et al., 1982, Taparowsky et al., 1982).

Chromosomale Translokationen eines Proto-Onkogens spielen wahrscheinlich keine prinzipielle Rolle bei der malignen Transformation von Zellen, doch sind sie als Modell interessant, weil sie beide vorher erwähnten Alternativen zur Folge haben können. Als Folge einer irregulären Zellteilung wird ein Chromosomenbruchstück mit einem Onkogen an ein anderes Chromosom rekombiniert. Wenn ein Proto-Onkogen genau im Bruchpunkt liegt, kann es geschehen, daß das Gen unter die Wirkung eines fremden Promotors gerät und dadurch überhaupt und/oder

wesentlich stärker exprimiert wird, wie es zum Beispiel bei Burkitt-Lymphomen für das translozierte myc-Gen gefunden wurde (Taub et al., 1982, Adams et al., 1983). Die Translokation kann aber auch eine Strukturänderung des Gens selbst bewirken. In Plasmozytomen der Maus konnte zum Beispiel für das translozierte myc-Gen eine verkürzte mRNA nachgewiesen werden (Shen-Ong et al., 1982).

Jeder der diskutierten Mechanismen, der ein Proto-Onkogen in ein aktives, zur Transformation führendes Gen verwandeln könnte, muß seine Wirkung schließlich über das Genprodukt, das Protein entfalten. Die Funktionen dieser Genprodukte sind bei weitem noch nicht geklärt, doch deuten sich bereits einige prinzipielle Reaktionsmechanismen an, die für bestimmte Gruppen von Onkogenprodukten zutreffen (Hunter, 1984).

Eine große Gruppe, die src-Familie, setzt sich aus dem c-src-, c-fps-, c-abl-, c-ros-, c-fes-, c-yes- und c-fgr-Gen zusammen, deren Proteine alle einen etwa 250 Aminosäuren langen Abschnitt von homologer Aminosäuresequenz haben. Bei drei weiteren Onkogenen, c-erbA, c-erbB und c-fms, lassen sich entfernter verwandte Sequenzen nachweisen. Die Proto-Onkogenprodukte haben Proteinkinase-Aktivität, phosphorylieren aber nicht, wie üblicherweise bekannt, Serin- und Threonin-, sondern Tyrosin-Reste (Brugge und Erikson, 1977, Collett und Erikson, 1978, Levinson et al., 1978, Sefton et al., 1981, Witte et al., 1980). Sie werden in der Zelle entweder als transmembranöse, oder als cytoplasmatische, an eine Membran gebundene Proteine gefunden, die in einigen Fällen (c-erbA, c-erbB und c-fms) Rezeptorfunktion für Wachstumsfaktoren haben (Bishop, 1985).

Die Proteine von c-mil, c-raf und c-mos phosphorylieren Serin- und Threonin-Reste. Die Kinasen sind nicht an Membranen gebunden, sondern

befinden sich im Cytoplasma (Bishop, 1985). Die Proteine von c-Ha-ras, c-Ki-ras und N-ras sind auf der Cytoplasmaseite an die Membran gebunden und regulieren wahrscheinlich die Aktivität der Adenylatcyclase. Bei der Aktivierung der ras-Proteine spielt die Bindung von GTP eine Rolle; eine Kontrolle der Funktion ist durch die GTPase-Aktivität gegeben (Bishop, 1985).

Zwei weitere Gruppen gibt es noch: die Gruppe der Wachstumsfaktoren, in die der vom c-sis-Gen kodierte Platelet Derived Growth Factor fällt, sowie die Gruppe der Proteine, die im Zellkern gefunden werden und von den Genen c-myc, c-myb, c-fos und c-ski kodiert werden (Bishop, 1985). In den nächsten Abschnitten wird ausführlich auf c-sis/PDGF, c-myc und c-fos eingegangen, da sie Ausgangspunkt und Grundlage der vorliegenden Arbeit sind.

1.5. Das c-sis-Gen und der Wachstumsfaktor PDGF (Platelet Derived Growth Factor)

1971 wurde das erste Mal ein RNA-Tumovirus bei einem Primaten gefunden. Es handelte sich um das Simian-Sarcoma-Virus (SSV), ein C-Typ-Retrovirus, das aus dem Fibrosarkom eines Wolläffchens isoliert wurde (Theilen et al., 1971, Wolfe et al., 1971). Bei Marmosets verursacht das Virus bei intramuskulärer Injektion Fibrosarkome (Wolfe et al., 1971), bei intrathekalen Injektion auch Gliome (Johnson et al., 1975), und es transformiert Zellen in Kultur nach in-vitro-Infektion (Wolfe et al., 1972, Aaronson, 1973). Das SSV ist ein replikationsdefektes Virus, das heißt, daß es für die Replikation das Helfervirus SSAV benötigt.

Zur Nukleinsäuresequenz des Onkogens v-sis (Devare et al., 1982) konnte eine weitgehend homologe Sequenz im Genom von normalen, nicht transformierten Zellen zahlreicher Säugetiere und des Menschen gefunden werden (Wong-Staal et al., 1981, Dalla-Favera et al., 1981). Das zelluläre sis-Proto-Onkogen befindet sich auf dem Chromosom 22 (Dalla-Favera et al., 1982b).

Seine weitgehende Sonderstellung in der Gruppe der Onkogene verdankt das c-sis-Gen den Erkenntnissen von Doolittle et al., (1983) und Waterfield et al., (1983). Sie stellten fest, daß die Aminosäuresequenz einer der beiden durch Disulfidbrücken verbundenen Peptidketten des PDGF, nämlich "PDGF-B" (Antoniades und Hunkapiller, 1983) mit dem vom v-sis-Gen kodierten Protein p28sis weitgehend homolog ist. Durch Nukleotidsequenzanalyse konnte gezeigt werden, daß das zelluläre sis-Gen für diese PDGF-Untereinheit kodiert (Josephs et al., 1984a,b, Johnsson et al., 1984, Chin et al., 1984). Damit war zum ersten Mal ein Zusammenhang zwischen viralem und zellulärem Genprodukt hergestellt und die Funktion eines Proto-Onkogens unter physiologischen Bedingungen gezeigt worden.

PDGF hat je nach Präparation ein Molekulargewicht zwischen 27 und 31 kd (James und Bradshaw, 1984). Es übt eine starke mitogene Wirkung auf Kulturzellen mesenchymalen Ursprungs und Gliazellen aus (Ross et al., 1974, Scher et al., 1979, Heldin et al., 1979). Das PDGF bindet an PDGF-Rezeptoren, die nur an diesen Zellen vorhanden sind und stimuliert dadurch eine Rezeptor-inhärente tyrosinspezifische Proteinkinase, die den Rezeptor autophosphoryliert (Waterfield et al., 1983). Nach Zugabe von PDGF zu Kulturzellen wurde eine Steigerung der DNA-Synthese bei Zellen von glattem Muskel, menschlichen Fibroblasten und Gliazellen

nachgewiesen (Westermarck und Wasteson, 1976). Berk et al., (1986) konnten weiter zeigen, daß PDGF eine konzentrationsabhängige Kontraktion der Rattenaorta auslöst, die stärker ist als bei dem klassischen Vasokonstriktor Angiotensin 2.

Bis jetzt sind folgende physiologische Funktionen des PDGF bekannt (siehe Übersichtsarbeit Ross et al., 1986): PDGF wird mit großer Wahrscheinlichkeit in Megakaryozyten gebildet und dann in den alpha-Granulaten der Thrombozyten gespeichert. Durch seine mitogene Wirkung auf Bindegewebszellen trägt es zur Wundheilung bei (Kaplan et al., 1979, Stiles, 1983). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß aktivierte menschliche Monozyten und Makrophagen die mRNA des c-sis-Proto-Onkogens enthalten und einen PDGF-ähnlichen Wachstumsfaktor freisetzen. Monozyten sind myeloischen Ursprungs und zirkulieren im Blut. Sie haben die Fähigkeit, sich im Gewebe zu Makrophagen zu differenzieren und dort über Monate zu bleiben. Bei der Wundheilung, bei entzündlichen Vorgängen, aber auch bei pathologischen Prozessen, wie zum Beispiel der Atherosklerose spielen sie eine Rolle. Sie könnten damit bei der Wundheilung im Gegensatz zu den Thrombozyten die Stimulation der Zellproliferation auf lange Sicht übernehmen (Shimokado et al., 1985, Martinet et al., 1986).

Das c-sis-Proto-Onkogen wird mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auch noch in mehreren anderen Klassen von Zellen exprimiert. So konnte die mRNA des c-sis in humanen endothelialen Zellen gefunden werden (Barrett et al., 1984). Auch die Synthese eines PDGF-ähnlichen Moleküls konnte in vaskulären endothelialen Zellen nachgewiesen werden (Di Corleto und Bowen-Pope, 1983, Collins et al., 1985). Beim Vergleich der PDGF-Syntheserate bei glatten Muskelzellen von Arterien unterschiedlich

alter Ratten zeigte sich, daß Zellen junger Ratten und Zellen von traumatisierten Arterien PDGF-identische oder -ähnliche Peptide produzieren, Zellen erwachsener Ratten dagegen nicht (Seifert et al., 1984, Walker et al., 1984). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß PDGF eine Funktion bei der Gefäßproliferation haben könnte.

Auch bei der Entwicklung des menschlichen Föten spielt das c-sis-Onkogen eine Rolle. In der humanen Plazenta exprimieren die Zellen des Zytotrophoblasten im 1. Trimenon das c-sis-Gen, ebenso wird ein PDGF-ähnliches Molekül freigesetzt (Goustin et al., 1985).

Abgesehen von den erwähnten speziellen Zellen gibt es keine physiologische Expression des c-sis-Gens. In gesunden, normal differenzierten Bindegewebszellen wird das c-sis-Gen nicht exprimiert (Eva et al., 1982). Deshalb ist es von besonderem Interesse, daß der Nachweis von c-sis-Expression in Tumoren gelang, die meist mesenchymalen Ursprungs waren: Bei der Untersuchung mehrerer hämatopoetischer Zellen konnten nur in der Zelllinie des primären T-Zell-Lymphoms HUT102 c-sis-Transkripte gefunden werden (Westin et al., 1982b). In einer ähnlichen Studie (Blick et al., 1984) konnte in 22 untersuchten Proben von Leukämiepatienten c-sis-mRNA nur in Zellen eines Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie gezeigt werden, so daß die c-sis-Expression in hämatopoetischen Zellen möglicherweise eine Ausnahme darstellt. Dagegen wiesen Eva et al., (1982) in 5 von 6 Sarkomzelllinien und 3 von 5 Glioblastomzelllinien c-sis-mRNA (4,2 kb) nach. In 15 Zelllinien von Karzinomen, Melanomen oder anderen Tumoren wurde keine c-sis-mRNA gefunden. Johnsson et al., (1985b) beschreiben eine c-sis-positive menschliche Glioma-Zelllinie (U-343 MGa C12).

Bei der Untersuchung von 27 Zelllinien (4 Sarkome, 16 Gliome, 2

Neuroblastome, 2 Karzinome, 1 normale Fibroblasten- und 2 normale Gliazelllinien) konnte eine PDGF-ähnliche Aktivität bei einer Osteosarkom-, einer Gliom- und einer Rhabdomyosarkomzelllinie identifiziert werden (Betsholtz et al., 1983). PDGF-ähnliche Wachstumsfaktoren fanden sich auch bei einer weiteren Osteosarkomzelllinie (Heldin et al., 1980) und einer Gliomzelllinie (Nister et al., 1984).

Bei einem menschlichen Glioblastom (A172) und einem Fibrosarkom (HT1080) konnten Pantazis et al., (1985) die Expression des c-sis-Gens und PDGF-Aktivität nachweisen. Graves et al., (1984) fanden c-sis-Transkripte und PDGF-ähnliche Proteine bei der menschlichen Osteosarkomzelllinie U-20S.

Seit langem ist bekannt, daß maligne Zellen in weitaus geringerem Maße auf Wachstumsfaktoren im Medium angewiesen sind, als normale Zellen (Holley, 1975). Das System c-sis/PDGF liefert damit die besten Voraussetzungen, um die Vorstellung zu belegen, daß maligne Transformation und die endogene Produktion von Wachstumsfaktoren über eine "autokrine" Wirkung in einem Zusammenhang stehen könnten (Sporn und Todaro, 1980). Die Erkenntnisse, die am viralen sis-Gen gewonnen wurden, weisen in diese Richtung, denn neueste Ergebnisse zeigen, daß durch Antikörper gegen PDGF die Proliferation und morphologische Veränderung der SSV-infizierten Zellen in Kultur zeitweise unterbunden werden kann, was darauf schließen läßt, daß die SSV-Transformation auf der autokrinen oder parakrinen Wirkung eines PDGF-agonistischen Proteins, z.B. des v-sis-Genproduktes beruht (Johnsson et al., 1985a).

1.6. Das c-fos-Gen

Das v-fos wurde in dem FBJ-Murine Osteosarcoma Virus (FBJ-MSV) gefunden, das aus dem spontan auftretenden Osteosarkom einer CF1-Maus isoliert wurde (Finkel et al., 1966). Auch das FBR-Murine Osteosarcoma Virus (FBR-MSV), das man in einem strahleninduzierten Mausosteosarkom fand, enthält das v-fos-Onkogen (Finkel et al., 1975, Lee et al., 1979). Das FBJ-MSV verursacht Neoplasien des Knorpel-Knochengewebes, die nicht metastasieren und als geringgradig maligne eingestuft werden (Finkel et al., 1966, Finkel und Biskis, 1968, Ward und Young, 1976). Fibroblasten werden durch v-fos in vitro transformiert (Levy et al., 1973). Das zelluläre fos-Proto-Onkogen wurde von Curran et al. 1982 gefunden. Es befindet sich auf dem Chromosom 14 (Barker et al., 1984). Die Proteine von v-fos und c-fos befinden sich im Zellkern (Curran et al., 1984).

Über die Funktion des c-fos in nicht-transformierten Zellen ist bisher folgendes bekannt: Es wird während der Embryonal- und Fötalentwicklung bei Mäusen exprimiert. Bei neugeborenen Mäusen beschränkt sich die c-fos-Expression auf "Knochengewebe" und "Hautgewebe" (Müller et al., 1982, 1983a).

In menschlichen Zellen ist die Situation der c-fos-Expression ähnlich: C-fos-Transkripte waren wesentlich erhöht in fötalen Membranen (Chorion, Amnion). Leicht erhöhte Expression fand sich in fötaler Placenta. Mit einem Antikörper gegen ein synthetisches Peptid, das mit der N-terminalen c-fos-Sequenz homolog ist, konnte in den gleichen Geweben auch das Produkt des c-fos nachgewiesen werden. Die größte Expression fand sich in extraembryonalen Geweben von Schwangerschaften

im letzten Trimenon (Adamson et al., 1985).

Neben den Zellen von fötalen Membranen gibt es noch einen zweiten Zelltyp, bei dem das c-fos-Gen mit der Zelldifferenzierung in Zusammenhang gebracht werden kann: die Makrophagen. In Makrophagen, die aus Knochenmark gewonnen wurden, konnte c-fos-Expression nachgewiesen werden. Die induzierte Differenzierung der menschlichen promyelozytischen Zelllinie HL60 hatte c-fos-Expression und Produktion des c-fos-Proteins zur Folge (Müller et al., 1984b, Müller et al., 1985). Dieser Anstieg der c-fos-Expression zeigt sich auch bei der Differenzierung der myeloischen Leukämie-Zelllinie WEHI-3B zu Monozyten (Gonda und Metcalf, 1984), sowie der monozytären Zelllinie U-937 zu Makrophagen (Mitchell et al., 1985).

Inzwischen ist auch bekannt, daß die Expression des c-fos-Gens Zellzyklus-abhängig ist. In gesunden humanen Fibroblasten in Zellkultur wird das c-fos in der S-Phase und beim Übergang von der G_0 - zur G_1 -Phase stärker exprimiert (Angel et al., 1985).

Über die Bedeutung des c-fos-Gens bei malignen Prozessen gibt es bis jetzt wenig Informationen. Die Untersuchung mehrerer Tumorarten (Lungenadenokarzinome, T-Zell-Lymphome, Fibrosarkom, renales Adenokarzinom, Mammatumor, Neuroblastom, maligne Myoblasten, Leydig-Zell-Tumor, embryonale Karzinome) auf c-fos-Transkripte blieb negativ (Müller et al., 1984a). Der Transfer von c-fos-Proto-Onkogenen in F9 Teratokarzinom-Stammzellen führt zur Expression von c-fos-mRNA und den entsprechenden Proteinen, sowie zur morphologischen Veränderung der Zellen (Müller und Wagner, 1984).

1.7. Das c-myc-Gen

Das v-myc-Gen entstammt dem Avian Myelocytomatosis Virus MC29, das 1964 von Ivanov et al. gefunden wurde. Es kann in Vögeln Karzinome, Sarkome und Myelozytome auslösen und in vitro epitheloide, fibroblastische und myeloide Zellen transformieren (Graf und Beug, 1978). Das analoge zelluläre Proto-Onkogen zu v-myc (Sheiness und Bishop, 1979, Sheiness et al., 1980) befindet sich beim Menschen auf dem Chromosom 8 (Dalla-Favera et al., 1982c). Das c-myc-Proto-Onkogen-Produkt ist wie das c-fos-Produkt im Zellkern lokalisiert (Hann et al., 1983, Persson und Leder, 1984).

Die bisherigen Arbeiten über die Expression des c-myc-Proto-Onkogens weisen dem c-myc eine Rolle in der normalen Hämatopoese zu (Müller und Verma, 1984). Seine Hauptaufgabe könnte darin bestehen, Zellen zur Proliferation anzuregen und diese aufrechtzuerhalten. Hinweise dafür bieten die Beobachtungen, daß in Zelllinien von Hühner-T-Zellen und Hühner-Fibroblasten unter dem Einfluß von Serumwachstumsfaktoren eine konstante Expression des c-myc-Gens nachgewiesen werden kann (Thompson et al., 1985) und die c-myc-Expression nach der Differenzierung von Zellen stark abfällt (Gonda und Metcalf, 1984). Andererseits zeigen neuere Ergebnisse bei 5 - 10 Wochen alten Embryonen hohe c-myc-Expression in ganz bestimmten Geweben (Keimzellen der Haut, Darmepithel, Bindegewebe), so daß zumindest in der Embryogenese die c-myc-Expression Ausdruck einer Gewebe-spezifischen Genregulation sein könnte (Pfeifer-Ohlson et al., 1985).

C-myc-Expression tritt bei einer Vielzahl von Tumoren, das heißt Sarkomen, Karzinomen, Leukämien und Melanomen auf, scheint also nicht

so spezifisch zu sein, wie zum Beispiel die c-sis-Expression (Westin et al., 1982b, Müller et al., 1983b, Sheiness et al., 1980, Eva et al., 1982). Auf die Bedeutung der Translokation des c-myc-Gens bei Burkitt-Lymphomen wurde schon weiter oben hingewiesen.

1.8. Zusammenhänge zwischen c-sis, c-fos und c-myc und deren Produkten

Viele Arbeiten machen deutlich, daß die Tumorgenese einen komplexen Prozeß darstellt und für die Transformation einer gesunden Zelle mehrere Faktoren erforderlich sind (Land et al., 1983). Diese Kenntnis wirft die Frage auf, ob bei der möglichen malignen Transformation durch Proto-Onkogene gleichzeitig mehrere und vor allem welche Proto-Onkogene exprimiert werden müssen.

Gerade für die oben ausführlicher beschriebenen Proto-Onkogene c-sis, c-fos und c-myc wurden einige Zusammenhänge über die Regulation ihrer Expression bekannt, die unter Umständen auch für den pathophysiologischen Prozeß der malignen Transformation Bedeutung haben könnten. Es zeigte sich, daß in vitro die Zugabe von PDGF zu dem Nährmedium in den Fibroblastenkulturen BALB/c-3T und NIH 3T3 eine Expression des c-fos-Gens auf RNA- und Proteinebene zur Folge hatte (Kruijer et al., 1984, Cochran et al., 1984, Greenberg und Ziff, 1984). Auch das c-myc-Gen wurde in vitro in BALB/c-3T3-Zellen und NIH 3T3-Zellen unter PDGF-Stimulation exprimiert (Kelly et al., 1983). In NIH 3T3-Zellen steigt nach PDGF-Stimulation zunächst innerhalb einer Stunde die c-fos-Expression steil an, ist aber bereits eine Stunde später nicht mehr nachweisbar, während die Expression des c-myc-Gens später auftritt und über mehrere Stunden bestehen bleibt, bevor sie

wieder ein relativ niedriges Niveau erreicht (Müller et al., 1984b). Armelin et al., (1984) stellten fest, daß Zellen nach Transfektion des mit einem starken Promotor versehenen c-myc-Gens nur noch EGF (Epidermal Growth Factor) und nicht zusätzlich noch PDGF benötigten, um zur Mitose angeregt zu werden. Auch wenn der Wachstumsfaktor EGF zu A431-Zellen in Kultur zugesetzt wird, steigt die Expression des c-fos- und c-myc-Gens an (Bravo et al., 1985).

Ähnliches konnte in einem komplexeren System gefunden werden. In den Cytotrophoblastenzellen von Placenta des späten 1. Trimenons waren das c-sis- und das c-myc-Gen exprimiert, und es wurden PDGF-ähnliche Proteine synthetisiert. Kultivierte man diese Trophoblastenzellen und versetzte sie dann mit PDGF, so wurde eine Erhöhung der c-myc-Expression festgestellt (Goustin et al., 1985). Es gibt also vielfältige Hinweise, daß ein Regelkreis zwischen diesen Genen besteht, wobei die genauen Abläufe nicht endgültig geklärt sind.

1.9. Fragestellungen und Ziele dieser Arbeit

In der vorliegenden Untersuchung steht das c-sis-Gen, vor allem wegen der bewiesenen Beziehung zum PDGF, im Mittelpunkt. Es wurde die Frage untersucht, ob sich in Tumoren mesenchymalen Ursprungs eine Expression des c-sis-Gens in Form der mRNA nachweisen läßt. Daneben interessierte, ob gleichzeitig mit der c-sis-Expression auch das c-fos- und das c-myc-Gen exprimiert wird. Bei allen bisherigen Veröffentlichungen wurden nur wenige Tumorzelllinien von meist unterschiedlicher Histologie auf c-sis-Expression untersucht, und es liegen bis jetzt noch keine Ergebnisse über die Expression in nativem Tumorgewebe vor. Deshalb war

ein Ziel dieser Arbeit, die c-sis-, c-fos- und c-myc-Expression in Tumorbiopsien aufzuklären, da Biopsien den ursprünglichen Zustand einer Tumorzellpopulation ohne die möglichen Verfälschungen durch Gewebekulturbedingungen darstellen. Daneben wurde die Expression dieser drei Gene in Zellkulturen von Osteosarkomzelllinien untersucht.

Anschließend an diese Untersuchungen wurde der Frage nachgegangen, ob sich bei Tumorzelllinien und Tumorbiopsien Unterschiede in der Organisation des c-sis-, c-fos- und c-myc-Gens gegenüber der Struktur dieser Gene in gesunden Zellen finden lassen würden.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Zellen

Für die Versuche zur Expression des c-sis-, c-fos- und c-myc-Gens und zur Organisation des c-sis-, c-fos- und c-myc-Gens wurden verschiedene Zelllinien verwendet.

Die Expression auf der mRNA-Ebene wurde für die SSV-transformierte, keine Viruspartikel produzierende Zelllinie NP1 (=Non producer, Bergholz et al., 1977) und drei Osteosarkomzelllinien (MOS25, SAOS2 und TE85/2) untersucht, wobei SAOS2 und TE85/2 aus Osteosarkomen von Kindern hervorgingen.

Für diese vier Zelllinien wurde auch die Organisation der obengenannten Gene untersucht. Als Kontrollzellen dienten eine Zelllinie von Fibroblasten (HE) und eine Zelllinie von Muskelzellen eines Patienten mit Osteosarkom (MosMu20). Eine Zelllinie von humanen Fibroblasten war mit SSV/SSAV infiziert (SSV, Born, 1981). Nierenzellen der Ratte waren

entsprechend NP1 SSV-transformiert und produzierten keine Viruspartikel (NRK/SSV/NP).

Des weiteren wurden Zellen erythroleukämischen Ursprungs mit megakaryozytären Markern (HEL; Papayannopoulou et al., 1983) untersucht, sowie eine Reihe von Zelllinien, die aus Tumorbiopsien stammten: neun Osteosarkomzelllinien (MOS13, 19, 20, 22, 24, 25, 26, SAOS2 und TE85/2), die Fibrosarkomzelllinien Fib3 und HT1080 (Rasheed et al., 1974) und die Zelllinie eines embryonalen Rhabdomyosarkoms (RD; McAllister et al., 1969).

2.2. Biopsien

Die mRNA-Expression für c-sis, c-fos und c-myc wurde in vier Fibrosarkombiopsien (Fib4, 5, 6, 7), in der Tumorbiopsie eines Patienten mit B-Zell-Lymphom (B-Lym) und in der nicht maligne infiltrierten Lymphknotenbiopsie eines Patienten mit malignem Melanom (Mel-LK) untersucht.

Die Versuche zur Organisation der drei Proto-Onkogene wurden mit Mel-LK, mit einer Biopsie nicht maligne infiltrierten Bindegewebes des gleichen Patienten (Mel-ges) und eines Patienten mit Fibrosarkom (Fib1-ges) durchgeführt. Als Tumorbiopsien standen drei Fibrosarkome (Fib1, 2, 5) und ein malignes Melanom (Mel) zur Verfügung.

2.3. Gewebekulturen

Die Zellkulturen wurden zunächst in Plastikpetrischalen (d=9,0cm, 64cm²) der Firma Nunc angelegt. Als Nährmedium diente für RD, HT 1080

und HEL Minimal Essential Medium Eagle (modifiziert) mit Earle's Salzen (Flow Laboratories) mit einem Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FKS, Gibco, 30 Min. bei 56° C inaktiviert), 5% NaHCO_3 , sowie 100 Einheiten/ml Penicillin und 0,5ml/500ml AmphotericinB (Serva). Für alle anderen Gewebekulturen wurde statt MEM Dulbecco's Modifikation von Eagle's Medium (Flow Laboratories) bei sonst gleichen Vorschriften verwendet. Die Zellkulturen auf den Petrischalen wurden in einem Heraeus Brutschrank bei 37° C in einer Atmosphäre von 5% CO_2 und mehr als 90% rel. Luftfeuchte gehalten. Waren 2 bis 3 Petrischalen einer Zellart mit einem dichten Zellrasen bedeckt, so wurden die Zellen in Zellkulturflaschen (175cm², Nunc) gebracht. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS-Lösung (0,1M Phosphat-gepufferte 0,89%ige NaCl-Lsg., pH7,2) gewaschen und anschließend 1 bis 2 Minuten trypsinisiert (0,25% Trypsin in PBS-Lsg.). Die Trypsinwirkung wurde durch Zugabe von Nährmedium gestoppt. In gleicher Weise wurden von den Plastikflaschen weitere Subkulturen hergestellt, bis für die Versuche ausreichende Mengen an Zellen vorhanden waren. Die Plastikflaschenkulturen waren nicht im oben beschriebenen Brutschrank, sondern befanden sich verschlossen in einem Wärmeschrank bei 37° C.

Gewebekulturen von HEL, der einzigen Suspensionszelle, mußten nur auf neue Plastikflaschen verteilt und mit neuem Medium versorgt werden. Sie wurden im Brutschrank kultiviert.

2.4. RNA

Da RNAsen im Gegensatz zu DNAsen wesentlich schneller arbeiten und nicht so leicht zu inhibieren sind, mußten bei Präparation von und

Versuchen mit RNA einige besondere Maßregeln beachtet werden. Hitzebeständige Gegenstände, wie Reagenzgläser wurden 6h bei 180° C, Plastikmaterial, wie Pipetten 8h bei 130° C sterilisiert. Hitzeempfindliche Gegenstände (Rubber-Policeman etc.) wurden in sterilem Aqua dest. mit Diethylpyrocarbonat (5µl/500ml, Sigma) aufbewahrt und das Wasser vor Gebrauch kurz aufgekocht. Alle verwendeten Lösungen hatten ebenfalls einen Zusatz von 5µl Diethylpyrocarbonat/500ml und wurden vor den Versuchen kurz aufgekocht. Außerdem wurden bei allen Versuchen Einmalhandschuhe getragen.

2.4.1. RNA-Präparation

Für die Gewinnung der RNA wurden bei den Zellkulturen 8 bis 10 Zellkulturflaschen mit dichtem Zellrasen (etwa $24 - 30 \times 10^7$ Zellen) verwendet. Der Zellbelag wurde zunächst einmal mit PBS gewaschen. Von da an wurden die Kulturflaschen auf Eiswasser gelagert. Mit etwas PBS wurden die Zellen dann mit dem Rubber-Policeman (Gummischaber) von der Unterlage gelöst und in Reagenzgläsern gesammelt. Nach 2 minütigem Zentrifugieren bei 1500U/min und Dekantieren des Überstandes blieb das Zellpellet zurück.

Die in flüssigem Stickstoff (-180° C) aufbewahrten Tumorbiopsien wurden mit einer sterilen Beißzange in kleinste Stückchen zerlegt. Die auf diese beide Arten gewonnenen Zellen wurden entsprechend der leicht abgewandelten Methode von Auffray und Rougeon, (1980), in 6M Harnstoff, 3M LiCl resuspendiert (10ml/g Zellmaterial) und diese Suspension noch einmal mit flüssigem Stickstoff stark heruntergekühlt. Darauf wurden die Zellen mit einem Mixer (Ultra-Turrax, Janke und Kunkel) zerstört

und die aufgebrochenen Zellen über Nacht bei -5°C aufbewahrt. Es folgte 30 Min. Zentrifugieren bei 14000g und Dekantieren des Überstandes. Das Pellet wurde aufgelöst in 2ml 10mM TEA, 0,5% SDS, 1mM EDTA, pH7,6 und dann 1ml Phenol und 1ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben. Beide Phasen wurden auf dem Vortex-Genie (Scientific Ind.) sehr gut und oft durchmischt. Nach 5 Min. Zentrifugieren bei 3000U/min und Entfernen der Phenolphase wurde das Gleiche noch einmal mit Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol, dann ausschließlich mit 2ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wiederholt. Von der am Schluß gewonnenen wässrigen RNA-Phase wurde ein Bruchteil für die photometrische Konzentrationsbestimmung entnommen, dem Rest wurde eine Spatelspitze Natriumacetat zugegeben und dann mit 2,5 Volumen absoluten Alkohols die RNA über Nacht bei -20°C ausgefällt.

Die RNA-Konzentration wurde mit dem Spectrophotometer UV120-02 (Shimadzu) gemessen. Bei einer Wellenlänge von 260nm entspricht 1 O.D. (Optische Dichte) einer RNA-Konzentration von $40\mu\text{g/ml}$.

2.4.2.Oligo(dT)-Cellulose Chromatographie

Zur Anreicherung der mRNA wurde Oligo(dT)-Cellulose Type7 von P-L Biochemicals verwendet. Die Oligo(dT)-Cellulose wurde in eine Säule gefüllt, der ein Photometer nachgeschaltet war. Ein damit verbundener Schreiber zeigte kontinuierlich die RNA-Konzentration an. Die Apparatur wurde zunächst durch 0,1M NaOH, 5mM EDTA sterilisiert. Als Kontrolle diente der Schreiber, der nach der Sterilisierung keinen Ausschlag anzeigen durfte. Durch Zugabe von High Salt (20mM TEA, 0,1% SDS, 1mM EDTA, 0,5M NaCl) wurde die Säule auf pH7,5 eingestellt.

Die alkoholgefällte RNA wurde 30 Min. bei 14000g zentrifugiert und das Pellet in 1ml High Salt aufgenommen. Nach 5 Min. Erhitzen bei 65° C und Abkühlen auf Raumtemperatur lief die RNA-Lösung viermal über die Oligo(dT)-Säule. Mit High Salt wurde dann solange nachgewaschen, bis der Schreiber anzeigte, daß sich keine ribosomale RNA mehr in der Säule befand.

Zum Auswaschen der nun an der Cellulose haftenden mRNA wurde Low Salt (10mM TEA, 1mM EDTA, 0,05% SDS) verwendet. Etwa 10ml des auf 65° C erhitzten Low Salt bewirkten eine weitgehende Entfernung der mRNA aus der Säule. Von der gewonnenen mRNA-Anreicherung wurde ein Bruchteil für die photometrische Mengenbestimmung entnommen. Der Rest wurde mit einer Spatelspitze Natriumacetat und Alkohol gefällt und bei -20° C aufbewahrt.

2.4.3. Glyoxal-Agarosegele und Formaldehyd-Agarosegele

Bei den Zelllinien NP1, TE85/2, SAOS2 und MOS25 wurde die RNA mit Hilfe von Glyoxal-Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Alle anderen Ergebnisse wurden mit Formaldehyd-Agarosegelen gewonnen, da diese Methode unserer Erfahrung nach bei Biopsien eine bessere Auftrennung versprach.

Glyoxal-Gele

Für die elektrophoretische Auftrennung wurden 1,1%ige Agarosegele verwendet. Nach Aufkochen der Agarose (Seakem, LE von FMC) in 10mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (pH7,0) wurde die homogene Flüssigkeit

wieder etwas abgekühlt und in den vorbereiteten Elektrophoresekasten gefüllt. Die erstarrten Gele wurden mit 20mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (pH7,0) überschichtet. Vorbereitete Aliquots mit 50µg RNA wurden 30 Min. bei 12000g zentrifugiert. Die Pellets wurden in 30µl Glyoxal-Lsg. (100µl DMSO(100%), 50µl Glyoxal (30%), 40µl H_2O , 10µl 10mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH7,0) aufgenommen. Als Marker wurde 16S und 23S ribosomale RNA aus *Escherichia coli* MRE 600 (Boehringer) verwendet. 2µl wurden in 28µl Glyoxallsg. pipettiert. Eine Stunde inkubierten die Proben bei 50° C. Nach Abschrecken in Eis und Zugabe von 5µl 10% Ficoll und 0,02% Bromphenolblau wurden sie in die Auftragsspalten des Gels pipettiert und für etwa 6h eine Spannung von 50 bis 90V angelegt.

Formaldehyd-Agarosegele

Bei diesen Gelen wurde die Agarose (1,1%) in 1xMOPS-Puffer (20mM 3-(N-Morpholino)-propan-sulfonsäure (MOPS, Hoechst), 5mM Natriumacetat, 1mM EDTA) aufgekocht, auf 60° C abgekühlt und mit 1/6 Volumen Formaldehyd (=2,2M, 37%ig, stabilisiert mit 10% Methanol, Merck) vermischt. 10 - 30µg der RNA-Proben wurden als trockenes Äthanolpräzipitat in Probenpuffer (30µl/25µg RNA; 1xMOPS, 50% Formamid, 2,2M Formaldehyd, 1% Ficoll, 0,02% Bromphenolblau) aufgenommen und 25 Min. bei 65° C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in 1xMOPS-Puffer mit 50 - 90V für 5 - 6h.

2.4.4. Northern Blot

Es folgte der Northern Blot, der ähnlich dem zuerst entwickelten Southern Blot abläuft (Southern, 1975). Dazu wurde das RNA-Gel nach der Elektrophorese ohne weitere Zwischenschritte auf 2 große Bogen Whatman 3MM-Papier gelegt, die seitlich von einer Glasplatte herunter in 20xSSC-Puffer (3M NaCl, 0,3M Trinatriumcitrat) tauchten. Auf das Gel wurde luftblasenfrei ein in 2xSSC (300mM NaCl, 30mM Trinatriumcitrat) äquilibrierter Nitrocellulosefilter (BA85, Porengröße 0,45µm, Schleicher&Schüll) gleicher Größe gelegt und auf allen vier Seiten mit ca. 5cm breiten Streifen Plastikfolie versehen, so daß die Ränder der Nitrocellulose ca. 2mm breit bedeckt waren. Darauf wurden 6 in 10xSSC getränkte Blatt 3MM-Papier gelegt, dann folgte ein ca. 15cm hoher Stapel aus Toilettenrolle und Papierhandtüchern. Die ersten 30 Min. war der Aufbau nur mit einer Glasplatte, dann zusätzlich mit einem 1/2kg Gewicht beschwert. Nach Ende des Blots wurde der Nitrocellulosefilter 5 Min. in 6xSSC gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und zur endgültigen Fixierung der RNA 2h bei 80° C gebacken.

2.5. DNA

2.5.1. DNA-Präparation

Es wurde das Verfahren nach Perucho et al., (1981) angewendet. Die Zellen von 4 - 5 Zellkulturflaschen (etwa $12 - 15 \times 10^7$ Zellen) wurden zunächst in PBS-Lsg. gewaschen, um dann in wenig PBS von der Plastikfläche mit einem Rubber-Policeman getrennt und darauf in

Zentrifugenröhrchen gebracht zu werden. Nach 5 Min. Zentrifugieren bei 1500U/min blieb nach Dekantieren des Überstandes ein Zellpellet. Die in flüssigem Stickstoff (-180°C) aufbewahrten Biopsien wurden zunächst mit einer sterilen Beißzange zerkleinert und dann in einem Mörser pulvrig gemahlen. Die Zellpellets und die zerkleinerten Biopsien wurden in Puffer (10ml/g Zellmaterial; 150mM NaCl, 10mM EDTA, 10mM Tris-HCl, pH7,5) resuspendiert. Nach Zugabe von Proteinase K (Merck; Endkonzentration 200 $\mu\text{g/ml}$) und SDS (Endkonzentration 0,4%) wurden die Zellen bei 60°C 15 - 20 Min. erhitzt und inkubierten dann bei 37°C über Nacht. Zu den lysierten Zellen wurden gleiche Volumen eines weiteren Puffers gegeben (650mM NaCl, 10mM EDTA, 10mM Tris-HCl, pH8,0). Danach wurden zweimal gleiche Volumen von Puffer-gesättigtem Phenol zugegeben und die zwei Phasen vorsichtig durchmischt. Nach 5 Min. Zentrifugieren bei 3000U/min wurde die untere Phenolphase abpipettiert und das ganze Verfahren noch einmal mit einem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (24:1) wiederholt. Aus dem nun proteinfreien Puffer wurde die DNA gewonnen, indem nach und nach 2 Volumen absoluten Alkohols (-20°C) zugegeben wurden und die ausfallende DNA auf einer zurecht gebogenen Pasteurpipette aufgewickelt wurde. Nach einmaligem Waschen in 70%igem und 100%igem Alkohol und Lufttrocknung wurde das Präzipitat in 15mM Tris-HCl (pH7,5), 1mM EDTA gelöst.

Die Photometermessung ermöglichte die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA-Lösung. 1 O.D. (Optische Dichte) entspricht 40 μg DNA/ml Lösung. War das Verhältnis des Wertes von 260nm zu einem zweiten Meßwert bei 280nm größer als 1,6, so genügte die Reinheit der DNA für die Versuche.

2.5.2.DNA-Spaltung durch Restriktionsenzyme

Für die Spaltung der DNA wurden BamH1 aus *Bacillus amyloliquefaciens* H und EcoR1 aus *Escherichia coli* BS5 (beide Boehringer) verwendet. BamH1 erkennt die Sequenz G/GATCC, EcoR1 die Sequenz G/AATTC.

Der Reaktionsansatz für die BamH1-Spaltung lief über Nacht (15h) bei 37° C:

20µl DNA-Lösung (1mg/2ml, insges. 10µg)

20µl H₂O dest.

5µl BamH1-10xPuffer (100mM Tris-HCl, 1M NaCl,
50mM MgCl₂, 10mM beta-Mercaptoäthanol, pH8,0)

3µl BamH1 (ca. 60 units)

Die EcoR1-Spaltung war nach 5h bei 37° C beendet:

20µl DNA-Lösung (1mg/2ml, insges. 10µg)

20µl H₂O dest.

4,5µl EcoR1-10xPuffer (1M Tris-HCl,
500mM NaCl, 100mM MgCl₂, pH7,5)

0,6µl EcoR1 (ca. 50 units)

Die Spaltungsreaktionen wurden abgestoppt

bei BamH1 mit 5µl 10% Ficoll + 0,02% Bromphenolblau,

3µl 0,25M EDTA,

bei EcoR1 mit 5µl 10% Ficoll + 0,02% Bromphenolblau,

1µl 0,5M EDTA.

2.5.3. Elektrophorese und Southern Blot

Zur elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente wurden 0,7%ige Agarosegele verwendet. Die Agarose (Seakem, LE von FMC) wurde in einer entsprechenden Menge Tris-Borat-Puffer (90mM Tris, 90mM Borsäure, 2mM EDTA, pH7,6) aufgenommen und erhitzt, bis eine homogene Flüssigkeit entstanden war. Danach wurde Ethidiumbromid (1µl EtBr/10ml Gel) zugegeben, das eine Sichtbarmachung der DNA unter UV-Licht (254nm) ermöglicht. Nachdem die flüssige Agarose im vorbereiteten Elektrophoresekasten erstarrt war, wurde das Gel mit Tris-Borat-Puffer überschichtet.

Die gesplattene DNA wurde 10 Min. auf 65° C erhitzt und dann in Eis abgeschreckt, um Einzelsträngigkeit zu erzielen. Nach Einfüllen der Proben in die Auftragsspalten lief die Elektrophorese bei 10mA über Nacht etwa 20h. Nach dieser Zeit hatte das als Marker für die Wanderungsgeschwindigkeit zugemischte Brom-Phenol-Blau 8 - 10cm zurückgelegt. Als Marker für die Längenbestimmung der DNA-Fragmente wurde Lambda-DNA, gespalten durch Hind3 und EcoR1 (Boehringer) verwendet. Nach der Elektrophorese wurde unter UV-Licht (254nm) die Spaltung und der Lauf der DNA-Bruchstücke beurteilt und zur Dokumentation mit einer Polaroidkamera ein Photo angefertigt. Anschließend wurde das Gel 2x15 Min. mit 0,5M NaOH, 1,5M NaCl denaturiert und danach 2x30 Min. mit 1M Tris (pH7,0), 1,5M NaCl neutralisiert.

Es folgte der Southern Blot (Southern, 1975). Als einziger Unterschied zum Northern Blot wurde 10xSSC-Puffer (1,5M NaCl, 0,15M Trinatriumcitrat) verwendet.

2.6. Hybridisierung

2.6.1. Verwendete Proben und deren Isolation

Für die sis-Hybridisierung wurde das rekombinierte Plasmid pSM-1 verwendet, das von Clarke et al., (1984) hergestellt wurde. Es besteht aus dem Vektor pcD und einem 2,7kb langen Abschnitt des c-sis-Gen, das die ersten drei Exons enthält. Durch die Spaltung mit den Restriktionsenzymen BSTE2 und PVU2 entstand die verwendete Probe von 5,5kb, die den vollständigen c-sis-Genabschnitt und einen Teil des Vektors enthielt.

Die fos-Hybridisierung wurde mit dem Plasmid p-c-fos(h) durchgeführt, das auf die Arbeit von Curran et al., (1983) zurückgeht. Als Vektor dient pBR322. Die Insertion ist 6kb lang. Sie besteht aus dem kompletten c-fos-Gen und angrenzenden DNA-Abschnitten und geht auf die Spaltung mit BamHI zurück. Die Restriktionsenzyme XhoI und NcoI spalten aus diesem DNA-Abschnitt ein Stück von etwa 3kb, das für die fos-Hybridisierung verwendet wurde.

Die, myc-Hybridisierung wurde mit einer 1,0kb langen c-DNA-Probe durchgeführt, die durch Spaltung mit PstI und BclI entstanden war. Sie enthielt das 2. Exon und einen Teil des 3. Exons (Croce et al., 1984).

Die rekombinierten Plasmide wurden in Bakterien transfektiert (siehe Maniatis et al., 1982) und dort vermehrt. Das Pellet von 500ml Bakterienkultur wurde in 10ml 50mM Glucose, 25mM Tris-Cl (pH 8,0) und 10mM EDTA aufgenommen und 5 Min. stehen gelassen. Danach wurden 20ml 0,2N NaOH, 1% SDS zugegeben und das Ganze 10 Min. auf Eis stehen gelassen. Dann wurden 15ml einer eiskalten 5M Kaliumacetat-Lsg. (pH

4,8) zugeführt und wiederum 10 Min. auf Eis stehen gelassen. Bei 4° C wurde die Lösung dann bei 20000U/min 20 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde gut mit gleichen Volumen von Phenol/Chloroform durchmischt. Nach 5 Min. Zentrifugieren bei 3000U/min wurde die obere Phase abgehoben, mit gleichen Volumen Chloroform vermischt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,6 Volumen Isopropanol versetzt und bei RT 15 Min. stehen gelassen. Durch 30 minütiges Zentrifugieren bei 12000g wurde ein Pellet gewonnen, das mit 70% Äthanol gewaschen und dann getrocknet wurde. Das Pellet wurde in 8ml TE (pH 8,0) aufgenommen (Maniatis et al., 1982).

Aliquots von 500µl wurden dann nach den oben erwähnten Vorschriften mit Restriktionsenzymen gespalten (siehe 2.5.2.) und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.5.3.). Die relevanten Banden wurden ausgeschnitten und in einem Dialyseschlauch in Gegenwart von 300-500µl des Tris-Borat-Puffers (siehe 2.5.3.) 1 - 2 h in einer Gelkammer unter Standardbedingungen elektrophoretisiert. Der Plasmid-haltige Puffer wurde anschließend entnommen und mit der Elutipsäule (Schleicher&Schüll) gereinigt. Dem Puffer wurden ca. 5ml 10mM Tris-Cl (pH 7,6), 5mM EDTA, 0,2M NaCl zugesetzt und diese Lösung durch die Säule gedrückt. Nach Waschen der Säule mit 5ml des gleichen Puffers wurde die DNA mit 0,4ml 10mM Tris-Cl (pH 7,6), 5mM EDTA, 1,0M NaCl eluiert und mit dem 2,5-fachen Volumen Äthanol gefällt.

2.6.2. Nick-Translation

Die Nick-Translation wurde entsprechend der Methode laut Maniatis et al., (1982) durchgeführt. Der Reaktionsansatz lautete:

2,5µl 10xNick-Translationspuffer (0,5M Tris-HCl, pH7,2, 0,1M
 MgSO₄, 1mM Dithiothreitol, 500µg/ml Bovines Serum-Albumin)
 je 0,5µl einer 1mM Lsg. von ATP, GTP und TTP
 0,5µl des Gens (1mg/ml, insges. 0,5µg)
 4µl H₂O
 0,5µl DNA-Polymerase (1µl = 5 units, Boehringer)
 1µl DNase1 (250ng/ml, Worthington)
 15µl 32 P-alpha-dCTP (3000-Ci/mmol, 10mCi/ml, insges. 150µCi;
 Amersham)

Die Reaktion lief 90 Min. bei 15° C. 1µl des Reaktionsansatzes wurden
 für die TCA-Fällung zur Bestimmung der eingebauten und spezifischen
 Radioaktivität verwendet. Bei den restlichen 24µl wurde die Reaktion
 durch 200µl 2mM EDTA abgestoppt. 250µl Phenol wurden zugegeben, beide
 Phasen durchmischt, nach 2 Min. Zentrifugieren bei 12000g die
 Phenolphase abpipettiert und der gleiche Vorgang noch einmal mit
 Chloroform wiederholt. Die radioaktive DNA in der wässrigen Phase wurde
 durch Zugabe von Natriumacetat und 2,5 Volumen 100%igen Alkohol über
 Nacht bei -20° C ausgefällt. Als trockenes Pellet nach Zentrifugation
 (12000g, 15 Min.) konnte es nach Lösen in H₂O dest. zur
 Hybridisierung verwendet werden.

1µl des Reaktionsansatzes wurden in 5ml 10%iger TCA
 (Trichloressigsäure), versetzt mit 100µl Fisch-DNA (1mg/ml),
 eingebracht. Nach kurzer Inkubation wurde es durch ein bereits einmal
 mit 10%iger TCA vorgewaschenes Filterblättchen gesaugt und dieses noch
 je drei Mal mit 10%iger TCA, dann mit 70%igem Äthanol nachgewaschen.
 Der trockene Filter wurde in ein kleines Plastikröhrchen mit Aquasol-2
 (New England Nuclear) gebracht und die Radioaktivität im

Flüssigszintillationszähler (MR 300, Kontron) bestimmt. Die spezifische Radioaktivität betrug meist etwa 4×10^8 cpm/ μ g DNA. Insgesamt standen also etwa 2×10^8 cpm zur Verfügung.

2.6.3. Hybridisierung der RNA

Die Filter wurden zunächst 5 Min. in 20xSSC gewaschen. Das Vorhybridisieren bei 42° C dauerte 8 - 20h. Die Lösung setzte sich folgendermaßen zusammen: 50% Formamid, 5xSSC, 50mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH6,5, 0,02% BSA, 0,02% Ficoll, 0,02% PVP + 250 μ g denaturierte E.coli-DNA/ml Vorhybridisierungslösung. Für die 48 stündige Hybridisierung wurde die gleiche Lösung verwendet. Pro Filter wurden etwa 7×10^6 cpm der denaturierten Probe zugesetzt. Nach erfolgter Hybridisierung wurden die Filter 4x5 Min. bei Raumtemperatur mit 2xSSC, 0,1% SDS, dann 2x15 Min. bei 50° C mit 0,1xSSC, 0,1% SDS gewaschen. Die Filter exponierten 5 - 20 Tage auf Kodak X-OmatS Röntgenfilmen. Für die erneute Verwendung wurden die Filter 1 h bei 80° C in 0,1xSSC, 0,1% SDS dehybridisiert.

2.6.4. Hybridisierung der DNA

Die Filter wurden 5 Min. in 6xSSC gewaschen. Danach wurden sie für eine Stunde bei 42° C in ein Plastiksäckchen mit Vorwaschlösung (50mM Tris, pH8,0 bei 1:10, 1M NaCl, 1mM EDTA, 0,1% SDS) eingeschweißt. Es folgten 4h bei 42° C in 5ml Vorhybridisierungslösung (50% Formamid, 5xDenhardt's Solution, 5xSSPE, 0,1% SDS), die pro 1ml 100 μ g E.coli-DNA enthielt. Die E.coli-DNA war zuvor 10 Min. gekocht und dann

abgeschreckt worden. Die Hybridisierung bei 42° C dauerte 48h. Dazu wurde zu 5ml Vorhybridisierungslösung die radioaktive Probe gegeben, so daß etwa 7×10^6 counts zur Verfügung standen. Die radioaktive Probe war ebenfalls auf 100° C erhitzt und abgeschreckt worden. Nach Abschluß der Hybridisierung wurden die Filter eine Stunde bei Raumtemperatur und 30 Min. bei 60° C in 2xSSC, 0,1% SDS gewaschen. Danach wurden die Filter einem Kodak X-OmatS Röntgenfilm für 5 - 20 Tage aufgelegt. Für die erneute Verwendung wurden die Filter 1 h bei 80° C in 0,1xSSC, 0,1%SDS dehybridisiert.

3. ERGEBNISSE

3.1. Untersuchungen zur Expression des c-sis-, c-fos- und c-myc-Gens

3.1.1. Untersuchungen in Zelllinien von Osteosarkomen

Ausgehend von den Resultaten mehrerer Arbeiten über die Expression des c-sis-Gens in Zelllinien gesunder und maligner Zellen (siehe 1.6.), sollte für einige Zelllinien, deren ursprüngliches Tumorgewebe als Osteosarkom klassifiziert worden war, die Frage geklärt werden, ob diese Zelllinien c-sis-mRNA exprimieren. Gleichfalls sollte geklärt werden, ob die Zellen neben der c-sis-Expression auch c-fos- und c-myc-Expression aufweisen.

Dazu wurde zunächst mit einer schnellen und einfachen Methode, der "Quick-Blot"-Methode (Bresser et al., 1983) eine größere Zahl von Osteosarkomzelllinien auf c-sis-Expression untersucht. Diese Methode

beruht auf der chaotropischen Wirkung von 12,2M NaJ, selektiv mRNA an Nitrocellulosefilter zu binden. Diese Methode weist jedoch teilweise falsch positive Resultate durch Kontamination mit rRNA und DNA auf und ist damit nur für negative Ergebnisse absolut aussagekräftig. Deshalb mußte für sis-positive Zelllinien zur genauen Abklärung der c-sis-Expression die Northern-Blot-Technik angewendet werden (siehe 2.4.).

Dieser Versuch wurde durchgeführt bei:

3 Osteosarkomzelllinien (MOS25, SAOS2 und TE85/2) und

1 Zelllinie, die SSV-transformiert war, keine Viruspartikel produzierte und wegen ihrer v-sis-mRNA-Expression als Kontrollzelllinie diente (NP1).

Die Zellysate wurden in einer hochmolaren Harnstoff/Lithiumchlorid-Lsg. aufgenommen und durch starkes Mixen die Zerstörung der Zellwände, Zellkerne und DNA erreicht. Bei -5° C bewirkte die Harnstoff/LiCl-Lsg., daß von den zerstörten Zellen spezifisch die mRNA ausfiel und die RNAsen nur minimale Aktivität entfalten konnten. Die gefällte mRNA wurde durch zweimalige Phenolisierung deproteinisiert und mit Äthanol ausgefällt. Vor der Durchführung der Elektrophorese wurde die mRNA-Präparation mit Hilfe der OligodT-Cellulose-Chromatographie gereinigt, um noch vorhandene ribosomale oder Transfer-RNA und DNA zu entfernen.

Für die elektrophoretische Auftrennung wurde dann die mRNA von NP1, MOS25, SAOS2 und TE85/2 in einem Glyoxalpuffer denaturiert, damit die

RNA-Moleküle ohne Sekundärstruktur, entsprechend ihrer wahren Größe aufgetrennt wurden. Durch den Northern Blot wurde nach abgelaufener Elektrophorese ein Abdruck des Agarosegels auf einen Nitrocellulosefilter gewonnen. Nach Erhitzen bei 80° C war die RNA irreversibel an die Nitrocellulose fixiert. Aufgrund der Tatsache, daß die Nitrocellulosefilter nach einer Hybridisierung mit einer radioaktiven Probe durch Dehybridisierung erneut hybridisierbar waren, wurde für jeden Filter nacheinander die sis-, fos- und myc-Hybridisierung durchgeführt.

3.1.1.1. Expression des c- sis -Gens

Im Northern-Blot-Experiment wiesen NP1 und die drei Osteosarkomzelllinien MOS25, SAOS2 und TE85/2 sis-Expression auf. Die Zelllinie NP1 diente dabei als positive Kontrollzelle für die Hybridisierung, da sie durch SSV (=v-sis) stabil transformiert ist und eine ständige v-sis-Expression zeigt. Die Größen der zwei v-sis-mRNAs sind 5,3kb und 2,7kb; sie stimmen nicht mit der c-sis-mRNA überein (4,2kb)(Johnsson et al., 1985b). Bei den Zelllinien SAOS2, TE85/2 und MOS25 fand sich ein Transkript von 4,2 kb, das von Eva et al., (1982) als typisch für die c-sis-mRNA beschrieben wurde.

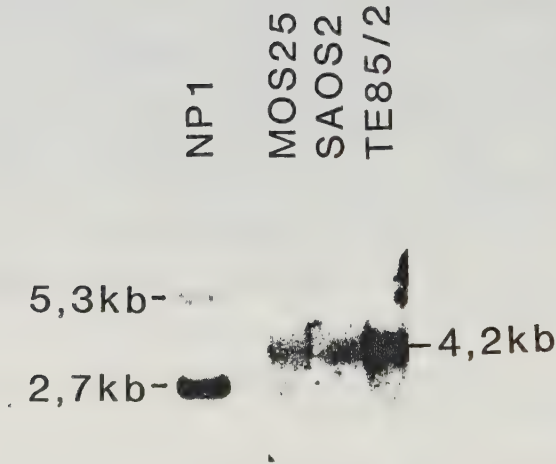


Abb.1 : C- sis -Expression bei den Zelllinien

NP1, MOS25, SAOS2 und TE85/2

3.1.1.2. Expression des c- fos -Gens

Bei der Expression des c-fos-Gens in Mäusezellen und menschlichen Zellen wurde ein c-fos-Gentranskript der Größe 2,2kb gefunden. Gelegentlich fand sich eine mRNA von 3,5kb, die vermutlich ein Vorläufermolekül darstellt (Müller et al., 1982, Müller et al., 1983a).

Die Zelllinie MOS25 zeigte in der Northern-Blot-Analyse schwach beide Transkripte von 2,2 und 3,5kb. SAOS2 und TE85/2 exprimierten nur die mRNA der Größe 3,5 kb. Die Kontrollzelllinie NP1 mit positiver v-sis-Expression zeigte keine fos-Expression.

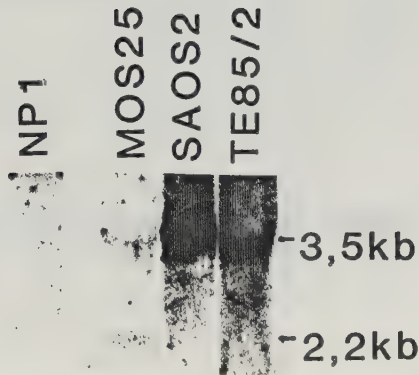


Abb.2 : C- fos -Expression bei den Zelllinien

NP1, MOS25, SAOS2 und TE85/2

3.1.1.3. Expression des c- myc -Gens

Die mRNA des c-myc-Gens hat in allen bisher untersuchten Zellen und Geweben von Vögeln und Menschen eine Größe von 2,5 - 2,7kb (Sheiness et al., 1980, Gonda et al., 1982, Müller et al., 1983b).

Für alle hier untersuchten Zelllinien konnte ein c-myc-Transkript von 2,5 - 2,7kb gefunden werden.

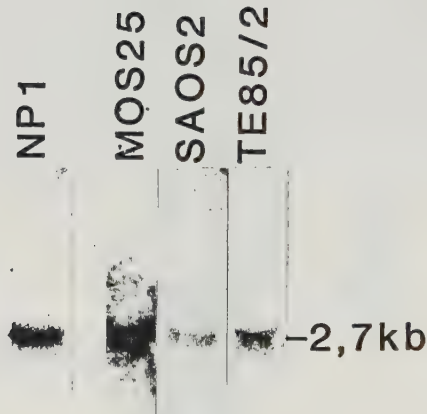


Abb.3 : C- myc -Expression bei den Zelllinien

NP1, MOS25, SAOS2 und TE85/2

3.1.2. Untersuchungen in Tumorbiopsien von Fibrosarkomen und einem Lymphom

Nachdem die Expression des c-sis-Gens , wie auch des c-fos- und c-myc-Gens für drei Zelllinien von Osteosarkomen analysiert worden war, wurde im nächsten Schritt die Expression des c-sis-, c-fos- und

c-myc-Gens in sechs Biopsien untersucht:

4 Fibrosarkombiopsien (Fib4, 5, 6, 7),

1 B-Lymphombiopsie (B-Lym) und

1 nicht maligne infiltrierte Lymphknotenbiopsie
eines Patienten mit malignem Melanom (Mel-LK).

Der Grund dafür war, daß in Tumorbiopsien der ursprüngliche Zustand eines malignen Gewebes gegeben ist und die Gefahr ausgeschaltet ist, daß Veränderungen der Zelllinien, die sich aus den Zellkulturbedingungen ergeben, mit in die Ergebnisse einfließen.

Die Biopsien wurden alle innerhalb kürzester Zeit nach der operativen Entfernung bis zur Aufarbeitung in flüssigem Stickstoff (-180°C) gelagert. Die Zerkleinerung der Biopsien geschah ebenfalls unter flüssigem Stickstoff, um die Aktivierung von RNAsen zu verhindern. Der weitere Versuchsaufbau war dann identisch mit dem bei den Zelllinien, außer daß die polyA^{+} -mRNA mit Formaldehyd-Agarosegelen aufgetrennt wurde, da diese Methode eine bessere Trennschärfe versprach. Der wesentliche Bestandteil des Probenpuffers war hier das Formaldehyd, das ebenfalls die RNA denaturiert und RNAsen zerstört.

3.1.2.1. Expression des c-sis-Gens

In den Biopsien von Fib4, Fib5, Fib6 und B-Lym konnte c-sis-mRNA der Größe 4,2 kb nachgewiesen werden, in den Biopsien des nicht maligne

infiltrierten Lymphknoten von Mel (Mel-LK) und Fib7 dagegen nicht.

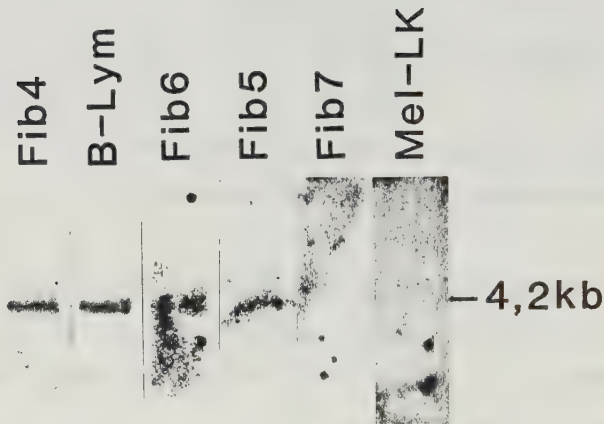


Abb.4 : C- sis -Expression bei den Tumorbiopsien
Fib4, B-Lym, Fib6, Fib5, Fib7 und Mel-LK

3.1.2.2. Expression des c- fos -Gens

In den Biopsien Fib4 und B-Lym wurde c-fos-mRNA von 2,2 kb, sowie auch deren Precursor von der Größe 3,5 kb gefunden. Bei Fib6 und Fib7 fand sich nur das 3,5kb große Precursor-Molekül. Fib5 und Mel-LK waren negativ.

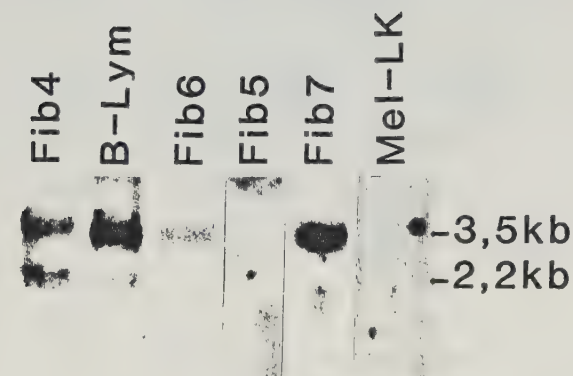


Abb.5 : C- fos -Expression bei den Tumorbiopsien

Fib4, B-Lym, Fib6, Fib5, Fib7 und Mel-LK

3.1.2.3. Expression des c- myc -Gens

Die c-myc-mRNA der Größe 2,7 kb konnte bei Fib4, Fib5, B-Lym und Mel-LK nachgewiesen werden. Fib6 und Fib7 waren negativ.

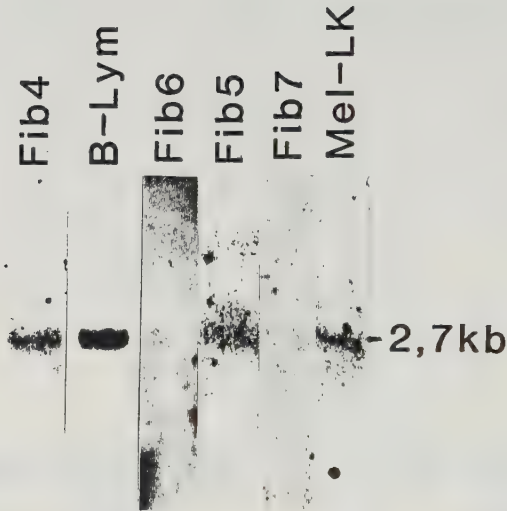


Abb.6 : C- myc -Expression bei den Tumorbiopsien

Fib4, B-Lym, Fib6, Fib5, Fib7 und Mel-LK

3.1.3. Zusammenfassung der c- sis -, c- fos -

und c- myc -Expression für jede

Tumorzelllinie und Tumorbiopsie

Betrachtet man die Ergebnisse speziell für jede einzelne Zelllinie oder Tumorbiopsie, so ergeben sich unterschiedliche Konstellationen der c-sis-, c-fos- und c-myc-Expression.

Tab.1 : Zusammenfassung der Ergebnisse zur Expression des
c- sis -, c- fos - und c- myc -Gens in Tumorzelllinien
und Tumorbiopsien

	c- <u>sis</u> - Expr.	c- <u>fos</u> - Expr.	c- <u>myc</u> - Expr.
MOS25	4,2kb	3,5/2,2kb	2,7kb
F1b4	4,2kb	3,5/2,2kb	2,7kb
B-Lym	4,2kb	3,5/2,2kb	2,7kb
SAOS2	4,2kb	3,5kb	2,7kb
TE85/2	4,2kb	3,5kb	2,7kb
F1b5	4,2kb	---	2,7kb
F1b6	4,2kb	3,5kb	---
F1b7	---	3,5kb	---
Mel-LK	---	---	2,7kb
NP1	5,3/2,7kb	---	2,7kb

3.2. Untersuchungen zur Organisation des c-sis-, c-fos- und c-myc-Gens in Tumorzelllinien und Tumorbiopsien

Anschließend an die Versuche über die Expression des c-sis, c-fos- und c-myc-Gens sollte die Frage geklärt werden, ob Änderungen in der Organisation dieser Gene, die der Tumorbildung vorausgegangen waren, unter Umständen die maligne Transformation von Zellen verursachen könnten. Es wurde deshalb die Organisation des c-sis-, c-fos- und c-myc-Gens für die bei der RNA-Expression verwendeten drei

Osteosarkomzelllinien und von den Tumorbiopsien mangels Ausgangsmaterials nur für Fib5 untersucht. Außerdem wurden zusätzlich weitere 3 Nicht-Tumorzelllinien, 3 SSV-transformierte Zelllinien und 9 Tumorzelllinien, sowie 3 Biopsien gesunden Gewebes und 3 Tumorbiopsien untersucht, für die aber, wiederum wegen Materialmangels im Rahmen der vorliegenden Arbeit die c-sis-, c-fos- und c-myc-Expression nicht aufgeklärt werden konnte. Das Ziel war, durch die Untersuchung einer relativ großen Anzahl von Zelllinien und Biopsien einen möglichen Polymorphismus für das c-sis-, c-fos- oder c-myc-Gen ausschließen zu können.

Als einfache Methode bietet sich dazu die Restriktionsenzymanalyse mit Hilfe der Southern-Blot-Technik an (siehe 2.5.). Zur DNA-Präparation wurden die in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Biopsien so weit wie möglich zerkleinert und genauso wie die aus den Kulturflaschen gewonnenen Zellen in einen Puffer mit Proteinase K und SDS gebracht. Dadurch wurde eine Aufspaltung der Zellwände erreicht und die RNA durch die zelleigenen RNAsen weitgehendst zerstört.

Die anschließende Phenolisierung bewirkte eine Entfernung der Proteine aus der wässrigen Phase. Die DNA wurde dann mit einem der beiden Restriktionsenzyme EcoR1 oder BamH1 versetzt, die nur eine bestimmte und bekannte Sequenz von Nukleinsäuren spalten, in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt, nach dem Southern-Blot-Verfahren auf Nitrocellulose übertragen und durch Erhitzen bei 80° C irreversibel an den Nitrocellulosefilter fixiert, so daß mehrmals hybridisiert und dehybridisiert werden konnte. Bei der Hybridisierung wurde dann das, durch Nick-Translation radioaktive sis-, fos- oder myc-Gen als Probe verwendet.

3.2.1. Organisation des c-sis-Gens

Bis vor kurzem waren 6 Exons des c-sis-Gens über eine DNA-Länge von 12,5kb bekannt (Ratner et al., 1985, Josephs et al., 1983, 1984a). Inzwischen konnte ein 7. Exon am 5'-Ende charakterisiert werden. Es ist mindestens 1050 Nukleotide lang (Rao et al., 1986).

Bei der Spaltung des c-sis-Gens ergeben sich folgende Fragmente: EcoR1 führt zu einer Bande von 14,5kb, die die 6 zuerst charakterisierten Exons enthält (Josephs et al., 1983, 1984a). BamH1 spaltet in zwei, die oben angeführten sis-Exons enthaltende Banden. Die größere hat ein Molekulargewicht von 8,1kb, die kleinere besitzt eine relative Wanderungsgeschwindigkeit von 1,9kb - 2,1kb (Clarke et al., 1984). Sie ist eine Doppelbande, die sich aus DNA-Fragmenten von ca. 2,4 und 1,8 kb zusammensetzt (Josephs et al., 1984a).

Bei 3 Osteosarkomzelllinien, die im Northern Blot

sis-positiv waren (MOS25, SAOS2, TE85/2),

1 Fibrosarkombiopsie, die im Northern Blot

sis-positiv war (Fib5),

und weiteren, nicht im Northern Blot untersuchten

2 Nicht-Tumorzelllinien (HE, MosMu20),

3 SSV-transformierten Zelllinien (NP1, SSV, NRK/SSV/NP),

9 Tumorzelllinien: 6 Osteosarkome (MOS13, 19, 20, 22, 24, 26),

2 Fibrosarkome (Fib3, HT1080)

1 Rhabdomyosarkom (RD),

1 Zelllinie mit megakaryozytären Eigenschaften (HEL),

3 Biopsien gesunden Gewebes (Mel-ges, Mel-LK, Fib1-ges)

3 Tumorbiopsien: 2 Fibrosarkome (Fib1, Fib2),

1 Malignes Melanom (Mel)

fanden sich im Sinne der bisher bekannten Ergebnisse mit Restriktionsenzymen keine Veränderungen, denn die EcoR1-Spaltung hatte das beschriebene DNA-Fragment von 14,5 kb zur Folge und die BamH1-Spaltung brachte jeweils eine Bande bei 8,1 kb und eine Doppelbande bei ca. 2,1 kb hervor. Lediglich bei der Tumorbiopsie Fib5 fand sich zusätzlich eine Doppelbande von etwa 6,0 kb. Da in den Zelllinien NP1, SSV und NRK/SSV/NP das v-sis-Gen durch Infektion an zufälligen Orten im Zellgenom integriert ist, zeigten sie ein Bild zahlreicher, nicht mit c-sis übereinstimmender DNA-Restriktionsfragmente. Die Zellen wurden als positive, qualitative und quantitative Kontrollen für die Hybridisierung mit der radioaktiven sis-Probe verwendet.

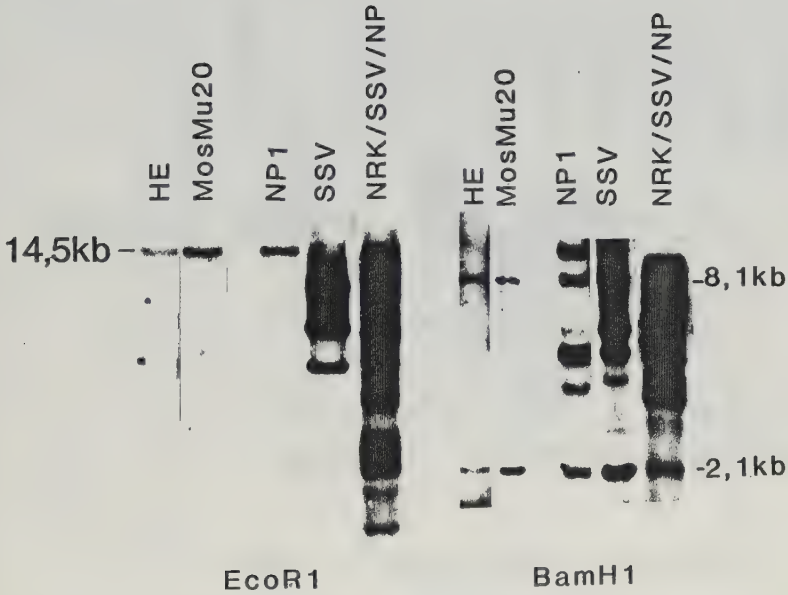


Abb.7 : EcoR1/BamH1-Spaltung, Southern Blot und sis -
Hybridisierung bei 2 Nicht-Tumorzelllinien
und 3 SSV-transformierten Zelllinien

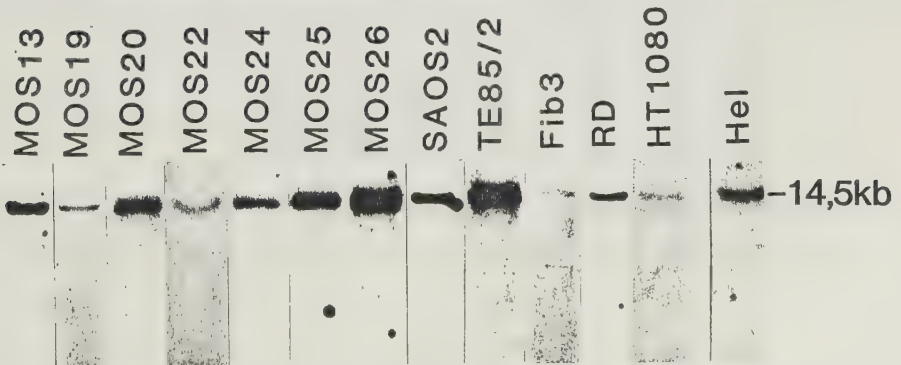


Abb.8 : EcoR1-Spaltung, Southern Blot und sis -Hybridisierung
bei 12 Tumorzelllinien und einer Zelllinie mit megakaryo-
zytären Eigenschaften

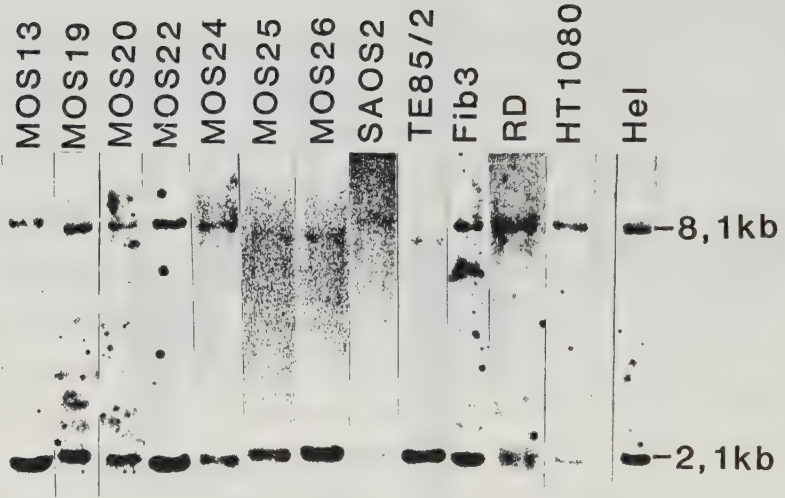


Abb.9 : BamH1-Spaltung, Southern Blot und *sis* -Hybridisierung
bei 12 Tumorzelllinien und einer Zelllinie mit megakaryo-
zytären Eigenschaften

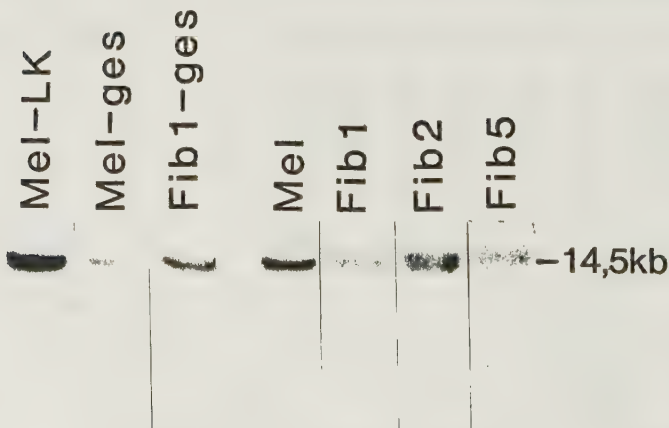


Abb.10 : EcoR1-Spaltung, Southern Blot und *sis* -Hybridisierung
bei 3 normalen Biopsien und 4 Tumorbiopsien

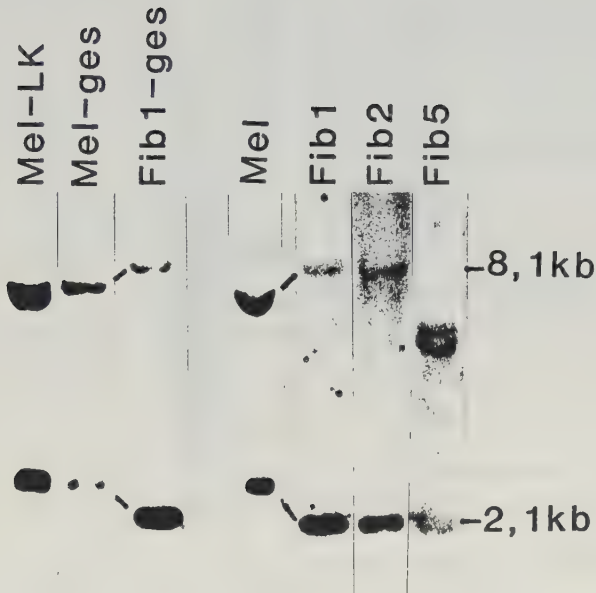


Abb.11 : BamH1-Spaltung, Southern Blot und *sis* -Hybridisierung
bei 3 normalen Biopsien und 4 Tumorbiopsien

3.2.2. Organisation des c- *fos* -Gens

Das c-*fos*-Gen hat vom Transkriptionsbeginn bis zu dem vermutlichen poly(A)-Signal eine Länge von ca. 3400 Nukleotiden (Van Beveren et al., 1983).

Das Restriktionsenzym EcoR1 spaltet außerhalb des c-*fos*-Gens und produziert ein DNA-Fragment von 9 kb. Bei der BamH1-Spaltung sind die DNA-Fragmente, die c-*fos*-Sequenzen tragen, 5,9, 0,9 und 0,7 kb groß (Curran et al., 1983).

Bei 3 Osteosarkomzelllinien, die im Northern Blot

fos-positiv waren (MOS25, SAOS2, TE85/2),

1 Fibrosarkombiopsie, die im Northern Blot

fos-negativ war (Fib5),

und weiteren, nicht im Northern Blot untersuchten

2 Nicht-Tumorzelllinien (HE, MosMu20),

9 Tumorzelllinien: 6 Osteosarkome (MOS13, 19, 20, 22, 24, 26),

2 Fibrosarkome (Fib3, HT1080),

1 Rhabdomyosarkom (RD),

1 Zelllinie mit megakaryozytären Eigenschaften (HEL),

3 Biopsien gesunden Gewebes (Mel-ges, Mel-LK, Fib1-ges)

3 Tumorbiopsien: 2 Fibrosarkome (Fib1, Fib2),

1 Malignes Melanom (Mel)

konnte gemäß der Literatur bei EcoR1-Spaltung die Bande von 9,0 kb und bei BamH1-Spaltung die Bande von 5,9 kb gefunden werden. Die BamH1-Fragmente von 0,7 und 0,9 kb wurden mit der hier verwendeten Methode nicht im Blot zurückgehalten und konnten nicht gezeigt werden.

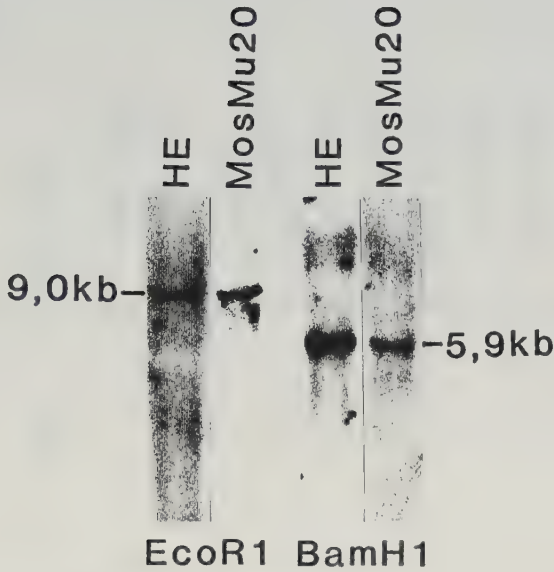


Abb.12 : EcoR1/BamH1-Spaltung, Southern Blot und *fos* -
Hybridisierung bei 2 Nicht-Tumorzelllinien

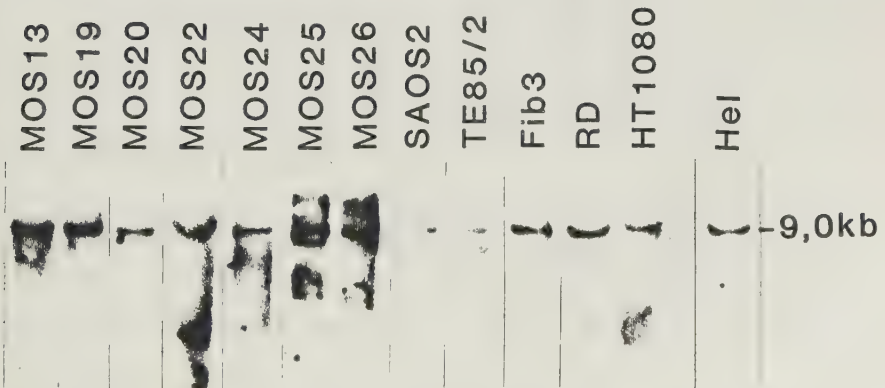


Abb.13 : EcoR1-Spaltung, Southern Blot und *fos* -Hybridisierung
bei 12 Tumorzelllinien und einer Zelllinie
mit megakaryozytären Eigenschaften

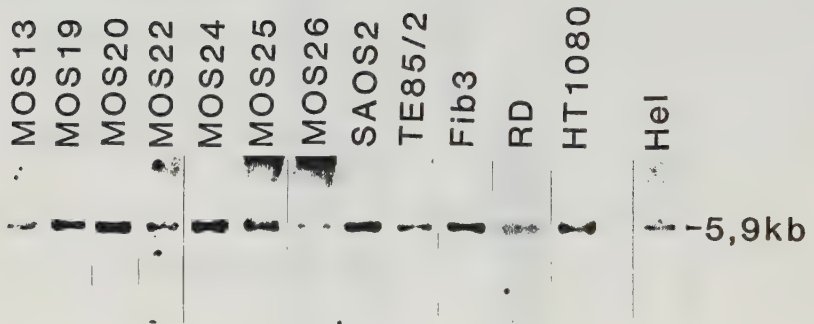


Abb.14 : BamHI-Spaltung, Southern Blot und fos -
 Hybridisierung bei 12 Tumorzelllinien und einer
 Zelllinie mit megakaryozytären Eigenschaften

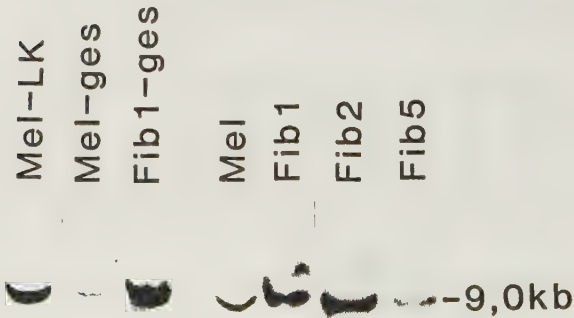


Abb.15 : EcoRI-Spaltung, Southern Blot und fos -Hybridisierung
 bei 3 normalen Biopsien und 4 Tumorbiopsien

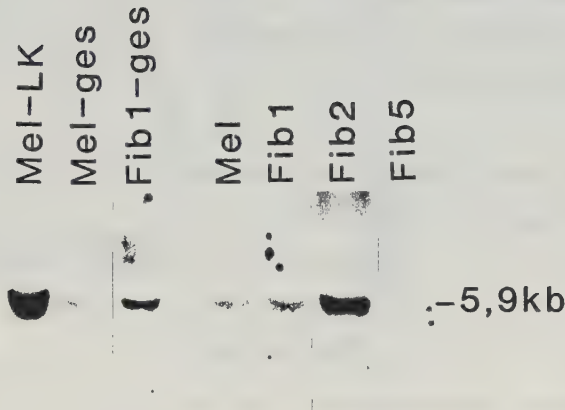


Abb.16 : BamHI-Spaltung, Southern Blot und fos -Hybridisierung
bei 3 normalen Biopsien und 4 Tumorbiopsien

3.2.3. Organisation des c- myc -Gens

Das c-myc-Gen wird von 3 Exons gebildet (Watt et al., 1983a,b, Colby et al., 1983, ar-Rushdi et al., 1983). Von der ersten Promotorsequenz bis zum letzten Stoppsignal beträgt das c-myc-Gen ca. 5,2 kb (Bernard et al., 1983).

EcoRI spaltet außerhalb des c-myc-Gens und führt zu einem DNA-Fragment von 12,5 kb. Die BamHI-Spaltung hat zwei DNA-Stücke von 25 und 6,6 kb zur Folge (Taub et al., 1982).

Die EcoR1-Spaltung bei

3 Osteosarkomzelllinien, die im Northern Blot

myc-positiv waren (MOS25, SAOS2, TE85/2)

1 Fibrosarkombiopsie, die im Northern Blot

myc-positiv war (Fib5),

und weiteren, nicht im Northern Blot untersuchten

2 Nicht-Tumorzelllinien (HE, MosMu20),

9 Tumorzelllinien: 6 Osteosarkome (MOS13, 19, 20, 22, 24, 26),

2 Fibrosarkome (Fib3, HT1080)

1 Rhabdomyosarkom (RD),

1 Zelllinie mit megakaryozytären Eigenschaften (HEL),

3 Biopsien gesunden Gewebes (Mel-ges, Mel-LK, Fib1-ges),

3 Tumorbiopsien: 2 Fibrosarkome (Fib1, Fib2),

1 Malignes Melanom

ergab stets das in der Literatur beschriebene 12,5 kb-Fragment.

Bei der BamH1-Spaltung konnte das Ergebnis von MOS24, 25, 26, SAOS2, TE85/2, Fib1 und Fib5 nicht verwendet werden, weil wahrscheinlich das große DNA-Fragment von 25 kb aufgrund schlechter Diffusionseigenschaften beim Southern Blot in nicht genügender Menge in den Nitrocellulosefilter gewandert war und so zu wenig Kopien des DNA-Fragmentes zur Verfügung standen, um bei der Hybridisierung ein positives Signal zu ergeben. Die anderen oben aufgeführten Zelllinien zeigten das DNA-Fragment von 25 kb. Das DNA-Stück von 6,6 kb konnte nicht gefunden werden, was auf die Verwendung einer anderen Probe zurückzuführen ist.

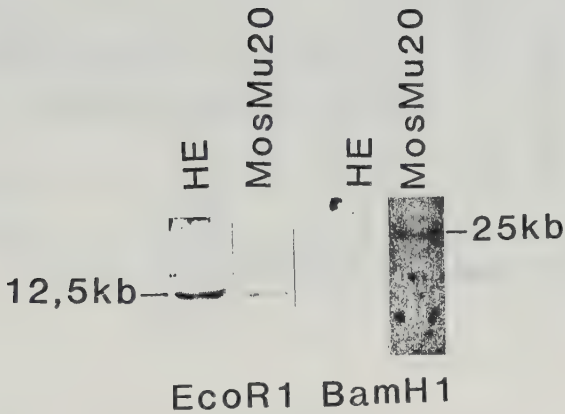


Abb.17 : EcoR1/BamH1-Spaltung, Southern Blot und myc -Hybridisierung
bei 2 Nicht-Tumorzelllinien

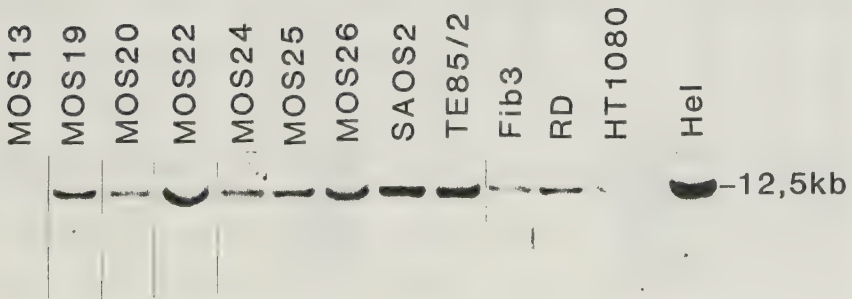


Abb.18 : EcoR1-Spaltung, Southern Blot und myc -
Hybridisierung bei 12 Tumorzelllinien und einer
Zelllinie mit megakaryozytären Eigenschaften

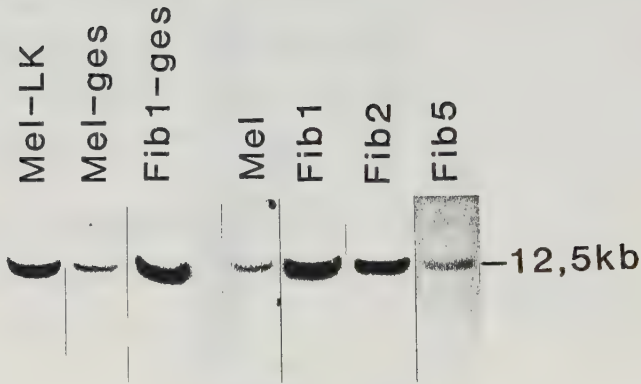


Abb.19 : EcoR1-Spaltung, Southern Blot und myc -Hybridisierung
bei 3 Biopsien gesunden Gewebes und 4 Tumorbiopsien

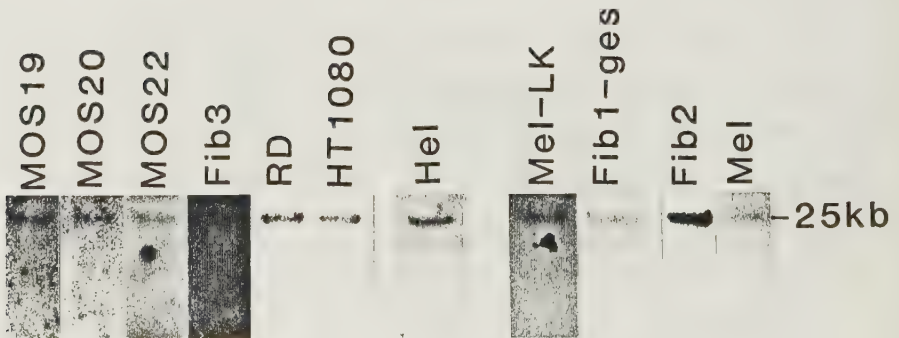


Abb.20 : BamH1-Spaltung, Southern Blot und myc -Hybridisierung
bei 6 Tumorzelllinien, einer Zelllinie mit megakaryozytären
Eigenschaften, 2 Biopsien gesunden Gewebes und 2 Tumorbiopsien

4. DISKUSSION

4.1. Expression des c-sis-, c-fos- und c-myc-

Gen in Tumorzelllinien und Tumorbiopsien

Die Onkogene der RNA-Tumoviren sind nachweislich für die maligne Transformation von Zellen verantwortlich, die mit RNA-Tumovirus infiziert wurden. Durch die Kenntnis der viralen Onkogene (v-onc) konnten die zellulären Gene gefunden werden, deren DNA-Sequenzen mit denen der viralen Onkogene sehr stark verwandt sind und die als Proto-Onkogene (c-onc) bezeichnet werden. Die zellulären Proto-Onkogene haben jedoch, zumindest primär keine onkogene Wirkung. Vielmehr sind sie wahrscheinlich für Differenzierungs- und Wachstumsvorgänge in der Zelle verantwortlich, sofern sie unter den physiologischen Regulationsmechanismen exprimiert werden. Es ist aber durchaus denkbar, daß die Proto-Onkogene auch transformierende Wirkungen entfalten können, wenn sie unter unkontrollierten, pathologischen Regulationsbedingungen exprimiert werden.

Als Genprodukte einiger Proto-Onkogene (c-sis, c-fms, c-erbA, c-erbB) wurden inzwischen bekannte Wachstumsfaktoren, beziehungsweise deren Rezeptoren gefunden. Das c-sis - Proto-Onkogen kodiert für die B-Polypeptidkette des Thrombozytenwachstumsfaktors PDGF (Doolittle et al., 1983, Waterfield et al., 1983), der eine wichtige Rolle bei der Wundheilung spielt (Kaplan et al., 1979, Stiles, 1983). Dieser Faktor übt eine starke mitogene Aktivität auf Zellen mesenchymalen Ursprungs, wie zum Beispiel die Fibroblasten des Mundgewebes aus, weil mesenchymale Zellen PDGF-Rezeptoren besitzen und PDGF über diese

Rezeptoren seine Wirkung entfaltet (Westermarck und Wasteson, 1976).

Es ist einleuchtend, daß eine unkontrollierte Expression des c-sis-Gens zu einem Zeitpunkt, zu dem das sis-Genprodukt für den augenblicklichen Zellmetabolismus weder nötig, noch physiologisch sinnvoll ist, schädlich für die betroffene Zelle oder Nachbarzellen mit PDGF-Rezeptoren sein könnte.

Aus der Literatur sind bisher Studien bekannt geworden, die eine Expression des c-sis-Gens in Zellen von Bindegewebstumoren (Sarkomen) und Glioblastomen zeigen. Nur in Ausnahmen fand sich c-sis-Expression in Tumorzellen epithelialen oder hämopoetischen Ursprungs. In gesunden ausdifferenzierten Bindegewebszellen konnte keine c-sis-Expression nachgewiesen werden (Eva et al., 1982, Westin et al., 1983b, Graves et al., 1984, Blick et al., 1984, Johnsson et al., 1985b).

Die Ergebnisse der oben genannten Studien wurden mit Hilfe von Zelllinien gewonnen, die aus Tumorbiopsien etabliert worden waren, während Versuche zur c-sis-Expression in frischen Tumorbiopsien nicht vorlagen. Das Ziel dieser Arbeit war einerseits, die Untersuchungen zur c-sis-Genexpression in Sarkom-Zelllinien fortzusetzen, um die entsprechenden Resultate zu bestätigen; andererseits sollte direkt an frischen Sarkombiopsien die c-sis-Expression abgeklärt werden, um zu zeigen, daß sich tatsächlich auch im nativen Tumorgewebe eine derartige fehlgesteuerte Expression des c-sis-Gens ereignet hatte.

Die vorliegenden Resultate weisen neben der c-sis-Expression in Zelllinien zum ersten Mal die Expression des c-sis-Proto-Onkogens direkt in Tumorbiopsien nach.

Neben der Frage der c-sis-Expression war von besonderem Interesse, ob bei den untersuchten Zelllinien und Tumorbiopsien gleichzeitig mit der

c-sis-Expression auch eine c-fos- und/oder c-myc-Expression auftrat. In jüngster Zeit wurden speziell für diese drei Onkogene in einigen Zelllinien exemplarisch Zusammenhänge über die Regulation ihrer Expression bekannt. So induziert der Platelet Derived Growth Factor (PDGF), wenn er zu Fibroblasten-Kulturen zugesetzt wird, in vitro eine c-fos-Expression (Krujer et al., 1984, Cochran et al., 1984, Greenberg und Ziff, 1984), wie auch eine c-myc-Expression (Kelly et al., 1983). Schon in der ersten Stunde nach PDGF-Zugabe erfolgt eine c-fos-Expression, die jedoch nach einer weiteren Stunde nicht mehr nachweisbar ist. Die entsprechende c-myc-Expression tritt später auf und bleibt für mehrere Stunden bestehen, bevor sie wieder ihr Ausgangsniveau erreicht (Müller et al., 1984b).

Es stellte sich also die Frage, ob sich auch bei dem hier untersuchten Tumormaterial derartige Aspekte eines Regelmechanismus zwischen Wachstumsfaktoren und anderen Proto-Onkogenen finden würden.

Die in Frage kommenden Zelllinien waren zunächst mit einer schnell durchzuführenden Dot-blot-Hybridisationsmethode auf das Vorhandensein von c-sis-Expression untersucht worden. Diese Variation der Dot-blot-Methode beruht auf der chaotropischen Wirkung von 12,2M NaJ, aus dem gesamten Zellysate selektiv mRNA an Nitrozellulosefilter zu binden (Bresser et al., 1983). Sie benötigt geringere Zellmengen und ist schneller durchzuführen, als die "Northern-Blot"-Analyse, weil die mRNA nicht extrahiert und gereinigt werden muß. Sie ist jedoch nicht sehr zuverlässig und weist teilweise falsch positive Resultate durch Kontamination mit DNA und ribosomaler RNA auf. Für die Selektion von mit Sicherheit expressionsnegativen Zelllinien ist sie aber gut geeignet. Der "Northern Blot" ist demgegenüber absolut spezifisch für

die c-sis-Expression, denn die Fehlerquellen des Quick-Blot sind ausgeschaltet: Durch die elektrophoretische Auftrennung der RNAs kann zum einen eine gefundene Expression eindeutig einer bestimmten RNA-Größe zugeordnet werden. Zum anderen läßt sich durch die zusätzliche Anreicherung der mRNA mit der OligodT-Säule sicher ausschließen, daß eine unspezifische Bindung an noch in der Präparation verbliebene DNA oder ribosomale RNA stattgefunden hat.

Alle drei Osteosarkomzelllinien MOS25, SAOS2 und TE85/2, die mit der "Northern-Blot"-Technik untersucht wurden, exprimierten eine c-sis-mRNA von der Größe 4,2 kb, die mit den Ergebnissen von Eva et al., (1982), übereinstimmt. Eine c-myc-mRNA der Größe 2,7 kb fand sich ebenfalls bei allen drei Zelllinien (Müller und Verma, 1984). Die c-fos-Expression war unterschiedlich stark: MOS25 exprimierte sowohl die von Müller et al., (1983a) als Precursor-Form beschriebene mRNA von 3,5 kb, als auch die maturaerte c-fos-mRNA von 2,2 kb, während bei SAOS2 und TE85/2 nur die Precursor-RNA nachgewiesen werden konnte.

Bis jetzt konnte eine normal-physiologische Expression des c-sis-Gens nur in Zelllinien von endothelialen Zellen (Barrett et al., 1984), in Makrophagen/Monozyten (Shimokado et al., 1985, Martinet et al., 1986) und in Zellen des Zytotrophoblasts von humaner Plazenta des 1. Trimenons (Goustin et al., 1985) gefunden werden. Aus diesem Grund ist anzunehmen, daß die hier beschriebene c-sis-Expression in drei Osteosarkomzelllinien tatsächlich keine normal-physiologische Expression ist, sondern im Zusammenhang mit der malignen Entartung der vorliegenden Zelllinien und der Aufrechterhaltung des malignen Prozesses gesehen werden muß. Die gleichzeitige Expression des c-fos- und des c-myc-Gens in diesen Zellen könnte Ausdruck dafür sein, daß das vom

c-sis-Gen produzierte PDGF die c-fos- und c-myc-Genexpression induziert und daß möglicherweise alle drei Gene für ungehemmtes malignes Wachstum erforderlich sind. Die c-fos-, wie die c-myc-Expression könnten jedoch auch Replikationsphasen des Zellzyklus widerspiegeln, denn in gesunden humanen Fibroblasten in Zellkultur ist gezeigt worden, daß c-fos in der S-Phase und beim Übergang von der Go- zur G1-Phase stärker exprimiert wird (Angel et al., 1985). Für das c-myc-Gen konnte sogar unter dem Einfluß von Serumwachstumsfaktoren eine konstante Expression in Zelllinien von Hühner-T-Zellen und Hühner-Fibroblasten nachgewiesen werden (Thompson et al., 1985). Für das c-sis-Gen sind bei diesbezüglichen Untersuchungen keine Anhaltspunkte für eine Expression in Abhängigkeit vom Zellzyklus gefunden worden. Wir schlußfolgern daher, daß zumindest die beschriebene c-sis-Expression tatsächlich eine pathophysiologische Aktivität darstellt. Gleiches könnte auch für die c-myc- und c-fos-Expression zutreffen, doch läßt sich nicht ausschließen, daß sie nur die physiologische Funktion dieser Gene zu den entsprechenden Zeitpunkten des Zellwachstums widerspiegeln, da sich die untersuchten Zellen in der Kultur nicht synchronisiert, sondern in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus befanden.

Zusätzlich bergen Untersuchungen zur Genexpression in Zelllinien die Gefahr, nicht genau der Situation des ursprünglich gegebenen Tumors zu entsprechen, weil in vitro während der Etablierung solcher Zelllinien durch die Wirkung von Wachstumsfaktoren im Nährmedium Ereignisse auftreten können, die zur Expression von vorher in vivo ruhenden Genen führen (Kelly, 1985).

Diese Unsicherheitsfaktoren sind nicht gegeben, wenn man die gleichen Versuche in nativem Tumorgewebe durchführt. Deshalb war der nächste

Schritt die direkte Untersuchung von Tumorbiopsien, um eine exakte, weitgehend unbeeinflusste "Momentaufnahme" der in-vivo-Expression des c-sis-, c-fos- und c-myc-Gens zum Zeitpunkt der Exstirpation zu erhalten.

Bei einem Fibrosarkom (Fib4) und einem B-Zell-Lymphom (B-Lym) konnten c-sis-, c-fos- und c-myc-mRNAs von entsprechendem Molekulargewicht in der "Northern-Blot"-Analyse gefunden werden. Bei drei weiteren Fibrosarkomen zeigte sich c-sis- und c-myc-Expression (in Fib5), c-sis- und c-fos-Expression (in Fib6) und einmal nur c-fos-Expression (in Fib7). Das heißt, daß bei vier von fünf untersuchten Tumorbiopsien c-sis-Expression nachgewiesen werden konnte, verbunden mit einer unterschiedlichen Expression des c-fos- und c-myc-Gens.

Die Problematik der direkten Tumoruntersuchung ergibt sich aus der Heterogenität des Biopsiematerials. Um die Bedeutung der c-sis-Expression beurteilen zu können, muß ausgeschlossen sein, daß andere im Biopsiematerial vorhandene Zellarten für die c-sis-Expression verantwortlich sind. Die Biopsie eines Sarkoms setzt sich aus Bindegewebe und Tumorzellen zusammen. Ein geringer Prozentsatz entfällt auf die Zellen der Gefäßversorgung und die Zellen des zirkulierenden Blutes.

Das Bindegewebe als Teil einer unspezifischen c-sis-Expression wurde von Eva et al., (1982) ausgeschlossen. Problematischer sind dagegen die Zellen des Gefäßsystems und des Blutes, denn sowohl in endothelialen Zellen (Barrett et al., 1984), als auch in Makrophagen/Monozyten (Shimokado et al., 1985, Martinet et al., 1986) wurde c-sis-Expression nachgewiesen. Der Anteil dieser Zellen an der Gesamtmasse der Biopsie war aber in allen Biopsien mit Wahrscheinlichkeit zu gering, als daß

sie die c-sis-Expression falsch positiv hätten beeinflussen können.

Als der entscheidende Beweis für diese Annahme kann die oben erwähnte Biopsie eines Fibrosarkoms (Fib7) angeführt werden, die nur c-fos-Expression aufwies. Würde die c-sis-Expression der c-sis-positiven Biopsien lediglich durch unspezifische Zellen im Tumorgewebe hervorgerufen werden, so hätte man auch für die Tumorbiose Fib7, noch dazu bei gleicher Histologie wie Fib 4, 5 und 6, eine c-sis-Expression erwarten müssen. Eine weitere Negativkontrolle ist die nicht maligne infiltrierte Lymphknotenbiopsie eines Patienten mit malignem Melanom. In diesem Gewebe läßt sich lediglich c-myc-Expression nachweisen, obwohl auch hier endotheliale Zellen und Makrophagen/Monozyten sicherlich zu einem bestimmten Prozentsatz vorhanden waren.

Daraus wird schlußgefolgert, daß die c-sis-Expression der vier c-sis-positiven Tumoren an den Transformationsereignissen der Tumorzellen beteiligt gewesen sein muß, wobei der Expression des c-fos- und c-myc-Gens eine unterstützende und/oder Folge-Funktion zukommen könnte. Die sich zwangsläufig ergebende Frage, ob die c-sis-Expression Ursache oder aber nur Konsequenz der malignen Transformation ist, kann zur Zeit noch nicht beantwortet werden, da ein entsprechender Versuch der experimentellen Anschaltung von c-onc-Genen noch nicht möglich ist. Faßt man die Ergebnisse der Tumorzelllinien und der Tumorbiosen zusammen, so exprimierten sieben von acht Tumorzellen das c-sis-Gen. Weiter wurden von diesen Tumorzellen meist sowohl das c-fos-, als auch das c-myc-Gen, oder aber zumindest eines von beiden exprimiert. Diese Ergebnisse zur c-sis-Expression in Tumoren weisen dem c-sis-Gen eine noch genauer zu definierende Rolle bei der Transformation von Zellen

mesenchymalen Ursprungs zu, was sich auch gut mit Veröffentlichungen vereinbaren läßt, wonach PDGF seine starke mitogene Wirkung in vitro nur bei Zellen von Bindegewebe und Gliazellen entfaltet (Ross et al., 1974, Scher et al., 1979, Heldin et al., 1979).

Während das c-sis-Gen bei der Entstehung von bösartigen epithelialen Geschwülsten sehr wahrscheinlich nicht beteiligt ist, könnte es weiterhin auch noch für das Transformationsgeschehen bei malignen Lymphomen wichtig sein, wie die oben angeführten Ergebnisse für ein B-Zell-Lymphom zeigen. Nach Westin et al., (1982b), die c-sis-Expression in der Zelllinie des primären T-Zell-Lymphoms HUT102 zeigten, ist das der erste Nachweis von c-sis-Expression in der Biopsie eines malignen Lymphoms.

Zu beachten bleibt dabei, daß bei der Interpretation der Ergebnisse unter c-sis-Expression immer die Existenz von gereifter c-sis-mRNA der Größe 4,2 kb verstanden wurde. Sie ist somit nicht unbedingt Ausdruck für die Transkription des c-sis-Gens, da im Rahmen dieser Arbeit keine detaillierteren Versuche, sogenannte "Run-off"-Experimente zu dieser Frage durchgeführt werden konnten.

Um dem c-sis-Gen seine endgültige Bedeutung für die maligne Transformation von Zellen zuweisen zu können, bedarf es einerseits der weiteren Erforschung der PDGF-Wirkung in und auf Zellen. Andererseits ist eine breite Untersuchung von in Frage kommenden Tumorarten dringend nötig, um eine statistisch gesicherte Aussage über die Häufigkeit der c-sis-Expression bei bestimmten Tumortypen machen zu können.

Unter diesen Prämissen und mit der Vorstellung, daß das c-sis-Gen in Tumoren unphysiologischerweise aktiv sein kann, PDGF produziert und in das Gefäßsystem sezerniert werden könnte, läßt sich in der Zukunft für

das Genprodukt Platelet Derived Growth Factor (PDGF) des c-sis-Gens unter Umständen eine Aufgabe als Tumormarker in der Früherkennung und Verlaufskontrolle von bestimmten Tumorerkrankungen denken.

4.2. Organisation des c-sis-, c-fos- und c-myc- Gens in Tumorzelllinien und Tumorbiopsien

Die Tatsache, daß in transformierten Zellen eine Expression von zellulären Proto-Onkogenen nachgewiesen werden kann, die in gesunden Zellen nicht vorhanden ist, gab Anlaß, der Frage nachzugehen, ob dieser Expression eine Mutation des c-sis-, c-fos- und c-myc-Gens vorausgegangen war. Aus diesem Grund bestand der zweite Teil der Arbeit in der Untersuchung der Organisation des c-sis-, c-fos- und c-myc-Gens. Wie eingangs erwähnt, gibt es zwei prinzipielle Vorstellungen über die maligne Entartung einer Zelle, die Dosis- und die Mutationstheorie.

Die Dosisstheorie geht davon aus, daß das Proto-Onkogen in seiner Struktur zwar intakt ist, doch das an und für sich physiologische Genprodukt in so hohen Konzentrationen in der Zelle vorliegt, daß es das Gleichgewicht des Zellmetabolismus stört, und es so zur Transformation kommt. Die ungewöhnlich hohe Proteinproduktion kann dabei einerseits auf der Modifikation der Promotorsequenzen oder auf der Insertion eines stärkeren Promotors beruhen, andererseits auf die Amplifikation des entsprechenden Proto-Onkogens zurückzuführen sein (vgl. Collins und Grondine, 1982., Dalla-Favera et al., 1982a, Westin et al., 1982b).

Die Mutationstheorie beruht auf der Vorstellung, daß das Proto-Onkogen selbst verändert wurde. Die Folge davon ist ein Genprodukt, das eine

andere Funktion erlangt hat oder nicht mehr den Regulationsmechanismen des nicht-mutierten Proteins unterworfen ist (vgl. Tabin et al., 1982, Reddy et al., 1982, Taparowsky et al., 1982).

Zur Untersuchung dieser Frage bietet sich die Verwendung von Restriktionsenzymen an, die jeweils nur eine genau definierte DNA-Sequenz spalten. Damit eröffnen sie die Möglichkeit, für eine größere Anzahl von Tumorzelllinien und Tumorbiopsien zu überprüfen, ob sie für ein bestimmtes Gen das gleiche Muster an DNA-Bruchstücken wie eine normale Zelle aufweisen.

Die verwendeten Restriktionsenzyme BamH1 und EcoR1 spalten innerhalb und außerhalb des c-sis-, c-fos- und c-myc-Gens (siehe 3.2.1., 3.2.2., 3.2.3.). Deshalb können sich theoretisch mehrere Veränderungen eines Proto-Onkogens durch ein abweichendes Muster der DNA-Restriktionsfragmente äußern. Das Proto-Onkogen könnte in seiner Gesamtgröße durch Mutationsereignisse verkürzt oder verlängert sein, das Gen könnte auf ein anderes Chromosom transloziert sein, und es wäre ebenfalls eine Punktmutation an der Spaltungsstelle des Restriktionsenzymns denkbar.

Es zeigte sich jedoch bei 12 Tumorzelllinien und 5 Tumorbiopsien, genauso wie bei 5 Kontrollzellen für die untersuchten Proto-Onkogene c-sis, c-fos und c-myc die aus früheren Arbeiten bekannte Anzahl und Größe von Elektrophorese-Banden (vgl. Wong-Staal und Gallo, 1982, Clarke et al., 1984, Curran et al., 1983, Taub et al., 1982). Lediglich in der Tumorbiopsie Fib5 fand sich bei der siz-Hybridisierung der BamH1-Spaltung neben den regulären Banden von 8,1 kb und 2,1 kb eine Doppelbande mit einer Größe von etwa 6 kb. Die Ursache dieser Beobachtung konnte nicht genau geklärt werden. Als einzig naheliegende

Deutung bietet sich an, daß hier ein Polymorphismus vorliegt und eines der beiden Allele des sis-Proto-Onkogens eine andere Organisation aufweist.

Die Zusammenfassung der DNA-Ergebnisse ergibt, daß die Ursachen der möglichen Beteiligung der Proto-Onkogene c-sis, c-fos und c-myc an der malignen Transformation von Zellen sicher nicht auf der Ebene der mit Restriktionsenzymen erfaßbaren, groben Strukturveränderungen zu suchen ist. Vielmehr müssen zum einen Veränderungen des komplexen Regulationsmechanismus der Gene und ihrer Proteine angenommen werden, die ihren Ansatzpunkt an der Transkription des Gens und an der Prozessierung der mRNA oder des Proteins haben könnten. Zum anderen könnten nur mit großem Aufwand nachweisbare Genmutationen auf Molekülebene für das mögliche maligne Potential von Proto-Onkogenen verantwortlich sein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das zelluläre sis-Proto-Onkogen kodiert für die B-Kette des Platelet Derived Growth Factor (PDGF). Unter physiologischen Bedingungen ist das c-sis-Gen in Monozyten, in endothelialen Zellen und wahrscheinlich in Megakaryozyten aktiv. Es gelang aber auch, c-sis-Expression, das heißt c-sis-mRNA in mehreren Tumoren mesenchymalen Ursprungs nachzuweisen, so daß sich die Frage stellt, ob das c-sis-Gen unter pathologischen Bedingungen an der malignen Transformation von Zellen beteiligt ist. Der Platelet Derived Growth Factor induziert in Fibroblastenzellen die Expression des c-fos- und c-myc-Gens, zwei Proto-Onkogenen, deren Genprodukte im Zellkern gefunden werden. Möglicherweise besteht

zwischen diesen drei Proto-Onkogenen ein Regelkreis.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob in Osteosarkomzelllinien die bisherigen Ergebnisse zur c-sis-Expression in malignen Zellen bestätigt werden können und ob eine Co-Expression des c-fos und c-myc vorliegt. In drei Osteosarkomzelllinien gelang der Nachweis von c-sis-mRNA. Ebenso fand sich c-fos- und c-myc-mRNA.

Alle bisherigen Veröffentlichungen beruhen auf Versuchen mit Tumorzelllinien. Es läßt sich dabei nicht ausschließen, daß die beschriebenen Genexpressionen lediglich Ausdruck der Gewebekulturbedingungen sind. Deshalb wurde im zweiten Schritt die Expression des c-sis-, c-fos- und c-myc-Gens in nativen Tumorbiopsien untersucht. Eine Fibrosarkombiopsie und eine B-Zell-Lymphombiopsie zeigten Expression aller drei Gene. Drei weitere Fibrosarkombiopsien zeigten c-sis- und c-myc-Expression, c-sis- und c-fos-Expression und einmal nur c-fos-Expression.

Es gibt mehrere Beispiele für die Aktivierung von Proto-Onkogenen zu Genen, die malignes Wachstum induzieren können. Dabei spielen chromosomale Translokationen, Genamplifikationen, Mutationen größerer Genabschnitte und Punktmutationen eine Rolle. Um mögliche Alterationen des c-sis-, c-fos- und c-myc-Gens in Tumoren zu erfassen, wurden zwölf Tumorzelllinien und vier Tumorbiopsien mit Hilfe von zwei Restriktionsenzymen untersucht. Im Rahmen der Untersuchungsmethode ergab sich jedoch lediglich bei einer Fibrosarkombiopsie der Hinweis auf ein mögliches Genrearrangement.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Aaronson, S.A. (1973): Biologic characterization of mammalian cells transformed by a primate sarcoma virus. *Virology*, 52, 562-567.
- Adams, J.M., Gerondaleis, S., Webb, E., Corcoran, L.M. and Cory, S. (1983): Cellular *myc*-gene is altered by chromosome translocation to immunoglobulin locus in murine plasmacytomas and is rearranged similarly in human Burkitt lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 1982-1986.
- Adamson, E.D., Meek, J. and Edwards, S.A. (1985): Product of the cellular oncogene, *c-fos*, observed in mouse and human tissues using an antibody to a synthetic peptide. *EMBO J.*, 4, 941-947.
- Alitalo, K., Schwab, M., Lin, C.L., Varmus, H.E. and Bishop, J.M. (1983): Homogenously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (*c-myc*) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 1707-1711.
- Angel, P., Rahmsdorf, H.J., Pötting, A. and Herrlich, P. (1985): *C-fos* mRNA levels in primary human fibroblasts after arrest in various stages of the cell cycle: Cancer Cells 3/Growth Factors and Transformation, ed. by Feramisco, J. et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 315-319.
- Antoniades, H.N. and Hunkapiller, M.W. (1983): Human platelet-derived growth factor (PDGF): amino terminal amino acid sequence. *Science*, 220, 963-965.
- Armelin, H.A., Armelin, M. C.S., Kelly, K., Stewart, T., Leder, P., Cochran, B.H. and Stiles, C.D. (1984): Functional role for *c-myc* in mitogenic response to platelet-derived growth factor. *Nature*, 310, 655-660.
- ar-Rushdi, A., Nishikura, K., Erikson, J., Watt, R., Rovera, G. and Croce, C.M. (1983): Differential expression of the translocated and of the untranslocated *c-myc* Burkitt lymphoma. *Science*, 222, 390-393.
- Auffray, C. and Rougeon, F. (1980): Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain messenger RNAs from total myeloma tumor RNA. *Eur. J. Biochem.*, 107, 303-314.
- Baltimore, D. (1970): Viral RNA-dependent DNA polymerase. *Nature*, 226, 1209-1211.
- Barker, P.E., Rabin, M., Watson, M., Breg, W.R. and Ruddle, F.H. (1984): Human *c-fos* oncogene mapped within chromosomal region 14q21-q31. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 5826-5830.
- Barrett, T.B., Gajdusek, C.M., Schwartz, S.M., McDougall, J.K. and Benditt, E.P. (1984): Expression of the *sis* gene by endothelial cells in culture and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 6772-6774.

- Bergholz, C.M., Wolfe, L.G. and Deinhardt, F. (1977): Establishment of simian sarcoma virus type 1 (SSV-1)-transformed nonproducer marmoset cell lines. *Int. J. Cancer*, 20, 104-111.
- Berk, B.C., Alexander, R.W., Brock, T.A., Gimbrone, M.A. and Webb, R.C. (1986): Vasoconstriction: A new activity for platelet-derived growth factor. *Science*, 232, 87-90.
- Bernard, O., Cory, S., Gerondakis, S., Webb, E. and Adams, J.M. (1983): Sequence of the murine and human cellular *myc* oncogenes and two modes of *myc* transcription resulting from chromosome translocation in B lymphoid tumours. *EMBO J.*, 2, 2375-2383.
- Betsholtz, C., Heldin, C.-H., Nister, M., Ek, B., Wasteson, A. and Westermark, B. (1983): Synthesis of a PDGF-like growth factor in human glioma and sarcoma cells suggests the expression of the cellular homologue to the transforming protein of simian sarcoma virus. *Biochem. And Biophys. Res. Comm.*, 117, 176-182.
- Bishop, J.M. and Varmus, H.E. (1982): Functions and origins of retroviral transforming genes. In: Weiss, R. et al. (ed), *Molecular biology of tumor viruses*, 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 999-1108.
- Bishop, J.M. (1983a): Cellular oncogenes and retroviruses. *Ann. Rev. Biochem.*, 52, 301-354.
- Bishop, J.M. (1983b): Cancer genes come of age. *Cell*, 32, 1018-1020.
- Bishop, J.M. (1985): Viral Oncogenes. *Cell*, 42, 23-38.
- Blick, M., Westin, E., Guttermann, J., Wong-Staal, F., Gallo, R., Mc Credie, K., Keating, M. and Murphy, E. (1984): Oncogene expression in human leukemia. *Blood*, 64, 1234-1239.
- Born, M. (1981): Biologische und biochemische Merkmale von Simian-Sarkom-Virus transformierten Marmosetzellen. Dissertation am Fachbereich Medizin der Universität Gießen.
- Bravo, R., Burckhardt, J., Curran, T. and Müller, R. (1985): Stimulation and inhibition of growth by EGF in different A431 cell clones is accompanied by the rapid induction of *c-fos* and *c-myc* proto-oncogenes. *EMBO J.*, 4, 1193-1197.
- Bresser, J., Hubbell, H.R. and Gillespie, D. (1983): Biological activity of mRNA immobilized on nitrocellulose in NaJ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 6523-6527.
- Brugge, J.S. and Erikson, R.L. (1977): Identification of a transformation-specific antigen induced by an avian sarcoma virus. *Nature*, 269, 346-347.
- Chen, J.H. (1980): Expression of endogenous avian myeloblastosis virus information in different chicken cells. *J. Virol.*, 36, 162-170.
- Chin, J.-M., Reddy, E.P., Givol, D., Robbins, K.C., Tronick, S.R. and Aaronson, S.A. (1984): Nucleotide sequence analysis identifies the

- human c-sis proto-oncogene as a structural gene for platelet-derived growth factor. *Cell*, 37, 123-129.
- Clarke, M.F., Westin, E., Schmidt, D., Josephs, S.F., Ratner, L., Wong-Staal, F., Gallo, R. and Reitz, M.S., Jr. (1984): Transformation of NIH 3T3 cells by a human c-sis cDNA clone. *Nature*, 308, 464-467.
- Cochran, B.H., Zullo, J., Verma, J.M. and Stiles, C.D. (1984): Expression of the c-fos gene and of a fos-related gene is stimulated by platelet-derived growth factor. *Science*, 226, 1080-1082.
- Colby, W.W., Chen, E.Y., Smith, D.H. and Levinson, A.D. (1983): Identification and nucleotide sequence of a human locus homologous to the v-myc oncogene of avian myelocytomatosis virus MC29. *Nature*, 301, 722-725.
- Collett, M.S. and Erikson, R.L. (1978): Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 2021-2024.
- Collett, M.S., Brugge, J.S. and Erikson, R.L. (1978): Characterization of a normal avian cell protein related to the avian sarcoma virus transforming gene product. *Cell*, 15, 1363-1369.
- Collins, S. and Grondine, M. (1982): Amplification of endogenous myc-related DNA sequences in a human myeloid leukemia cell line. *Nature*, 298, 679-681.
- Collins, T., Ginsburg, D., Boss, J.M., Orkin, S.H. and Pober, J.S. (1985): Cultured human endothelial cells express platelet-derived growth factor B chain: cDNA cloning and structural analysis. *Nature*, 316, 748-750.
- Crick, F. (1970): Central dogma of molecular biology. *Nature*, 227, 561-563.
- Croce, C.M., Erikson, J., Nishikura, K., ar-Rushdi, A., Giallongo, A., Rover, G., Finan, J. and Nowell, P.C. (1984): Chromosomal translocations and c-myc activation in Burkitt's lymphoma. *Cancer Cells 2/Oncogenes and viral genes*, ed. by Vande Woude, G.F. et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 235-242.
- Curran, T., Peters, G., Van Beveren, C., Teich, N.M. and Verma, I.M. (1982): The FBJ murine osteosarcoma virus: identification and molecular cloning of biologically active proviral DNA. *J. Virol.*, 44, 674-682.
- Curran, T., MacConnell, W.P., van Straaten, F. and Verma, I.M. (1983): Structure of the FBJ murine osteosarcoma virus genome: molecular cloning of its associated helper virus and the cellular homolog of the v-fos gene from mouse and human cells. *Mol. Cell. Biol.*, 3, 914-921.
- Curran, T., Miller, A.D., Zokas, F.L. and Verma, I.M. (1984): Viral and cellular fos gene products are located in the nucleus. *Cell*, 36, 259-268.
- Dalla-Favera, R., Gelmann, E.P., Gallo, R.C. and Wong-Staal, F. (1981): A human onc gene homologous to the transforming gene (v-sis) of simian

sarcoma virus. *Nature*, 292, 31-35.

Dalla-Favera, R., Wong-Staal, F. and Gallo, R.C. (1982a): Onc-gene amplification in promyelocytic leukemia cell line HL-60 and primary leukemic cells of the same patient. *Nature*, 299, 61-63.

Dalla-Favera, R., Gallo, R.C., Gialongo, A. and Croce, C.M. (1982b): Chromosomal localization of human homolog (*c-sis*) of the simian sarcoma virus onc gene. *Science*, 218, 686-688.

Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R.C. and Croce, C.M. (1982c): Human *c-myc* onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 7824-7827.

Dalton, A.J., Melnick, J.L., Bauer, H., Beaudreau, G., Bentvelzen, P., Bolognesi, D.P., Gallo, R.C., Graffi, A., Haguenu, F., Heston, W., Huebner, R., Todaro, G. and Heine, V.I. (1974): The case for a family of reverse transcriptase viruses: *Retroviridae*. *Intervirology*, 4, 201-206.

Devare, S.G., Reddy, E.P., Robbins, K.C., Andersen, P.R., Tronick, S.R. and Aaronson, S.A. (1982): Nucleotide sequence of the transforming gene of simian sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 3179-3182.

DiCorleto, P.E. and Bowen-Pope, D.F. (1983): Cultured endothelial cells produce a platelet-derived growth factor-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 1919-1923.

Doolittle, R.F., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E., Devare, S.G., Robbins, K.C., Aaronson, S.A. and Antoniades, H.N. (1983): Simian sarcoma virus onc-gene, *v-sis*, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. *Science*, 221, 275-277.

Duesberg, P.H. (1985): Activated proto-onc genes: sufficient or necessary for cancer?, *Science*, 228, 669-677.

Eva, A., Robbins, K.C., Andersen, P.R., Srinivasan, A., Tronick, S.R., Reddy, E.P., Ellmore, N.W., Galen, A.T., Lautenberger, J.A., Papas, T.S., Westin, E.H., Wong-Staal, F., Gallo, R.C. and Aaronson, S.A. (1982): Cellular genes analogous to retroviral onc genes are transcribed in human tumour cells. *Nature*, 295, 116-119.

Finkel, M.P., Biskis, B.O. and Jenkins, P.B. (1966): Virus induction of osteosarcomas in mice. *Science*, 151, 698-701.

Finkel, M.P. and Biskis, B.O. (1968): Experimental induction of osteosarcomas. *Prog. Exp. Tumor Res.*, 10, 72-111.

Finkel, M.P., Reilly, C.A., Jr. and Biskis, B.O. (1975): Viral etiology of bone cancer. *Front. Radiat. Ther. Oncol.*, 10, 28-39.

Gonda, T.J., Sheiness, D.K. and Bishop, J.M. (1982): Transcripts from the cellular homolog of retroviral oncogenes: distribution among chicken tissues. *Mol. Cell. Biol.*, 2, 617-624.

Gonda, T.J. and Metcalf, D. (1984): Expression of *myb*, *myc* and *fos*

- proto-oncogenes during the differentiation of a murine myeloid leukemia. *Nature*, 310, 249-251.
- Goustin, A.S., Betsholtz, C., Pfeifer-Ohlsson, S., Persson, H., Rydner, J., Bywater, M., Holmgren, G., Heldin, C.-H., Westermark, B. and Ohlsson, R. (1985): Coexpression of the sis and myc proto-oncogenes in developing human placenta suggests autocrine control of trophoblast growth. *Cell*, 41, 301-312.
- Graf, T. and Beug, H. (1978): Avian leukemia viruses: interaction with their target cells in vivo and in vitro. *Biochem. Biophys. Acta*, 516, 269-299.
- Graves, D.T., Owen, A.J., Barth, R.K., Tempst, P., Winoto, A., Fors, L. and Hood, L.E. (1984): Detection of c-sis transcripts and synthesis of PDGF-like proteins by human osteosarcoma cells. *Science*, 226, 972-974.
- Greenberg, M.E. and Ziff, E.B. (1984): Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature*, 311, 433-438.
- Hann, S.R., Abrams, H.D., Rohrschneider, L.R. and Eisenmann, R.N. (1983): Proteins encoded by v-myc and c-myc oncogenes: Identification and localization in acute leukemia virus transformants and bursal lymphoma cell lines. *Cell*, 34, 789-798.
- Heldin, C.H., Westermark, B. and Westesson, A. (1979): Platelet-derived growth factor: purification and partial characterization. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 76, 3722-3726.
- Heldin, C.-H., Westermark, B. and Westesson, A. (1980): Chemical and biological properties of a growth factor from human cultured osteosarcoma cells: resemblance with platelet-derived growth factor. *J. Cell. Physiol.*, 105, 235-246.
- Hinuma, Y., Nagata, K., Hanaoka, M., Nakai, M., Matsumoto, T., Kinoshita, K.I., Shirakawa, S. and Miyoshi, I. (1981): Adult T-cell leukemia: Antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 6476-6480.
- Holley, R.W. (1975): Control of growth of mammalian cells in cell culture. *Nature*, 258, 487-490.
- Huebner, R.J. and Todaro, G.J. (1969): Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 64, 1087-1094.
- Hunter, T. (1984): Die Proteine der Onkogene. *Spektrum der Wissenschaft*, Okt., 106-119.
- Ivanov, X., Mladenov, Z., Nedyalkov, S., Todorov, T.G. and Yakimov, M. (1964): Experimental investigations into avian leucoses. 5. Transmission, haematology and morphology of avian myelocytomatosis. *Bull. Inst. Pathol. Comp. Anim. Acad. Bulg. Sci.*, 10, 5-38.
- Jacob, F. and Monod, J. (1961): Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Molec. Biol.*, 3, 318-356.
- James, R. and Bradshaw, R.A. (1984): Polypeptide growth factors. *Ann.*

Rev. Biochem., 53, 259-292.

Johnson, L., Jr., Wolfe, L.G., Whisler, W.W., Norton, T., Thakkar, B. and Deinhardt, F. (1975): Induction of gliomas in marmosets by simian sarcoma virus, type 1 (SSV-1). *Asst. Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 16, 119.

Johnsson, A., Heldin, C.-H., Wasteson, A., Westermark, B., Deuel, T.F., Huang, J.S., Seeburg, P.H., Gray, A., Ullrich, A., Scrase, G., Stroobant, P. and Waterfield, M.D. (1984): The c-sis gene encodes a precursor of the B chain of platelet-derived growth factor. *EMBO J.*, 3, 921-928.

Johnsson, A., Betsholtz, C., Heldin, S.-H. and Westermark, B. (1985a): Antibodies against platelet-derived growth factor inhibit acute transformation by simian sarcoma virus. *Nature*, 317, 438-440.

Johnsson, A., Betsholtz, C., Von der Helm, K., Heldin, C.-H. and Westermark, B. (1985b): Platelet-derived growth factor agonist activity is exerted by a secreted form of the v-sis oncogene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 1721-1725.

Josephs, S.F., Dalla-Favera, R., Gelmann, E.P., Gallo, R.C. and Wong-Staal, F. (1983): 5' viral and human cellular sequences corresponding to the transforming gene of simian sarcoma virus. *Science*, 219, 503-505.

Josephs, S.F., Guo, C., Ratner, L. and Wong-Staal, F. (1984a): Human proto-oncogene nucleotide sequence corresponding to the transforming region of simian sarcoma virus. *Science*, 223, 487-491.

Josephs, S.F., Ratner, L., Clarke, M.F., Westin, E.H., Reitz, M.S. and Wong-Staal, F. (1984b): Transforming potential of human c-sis nucleotide sequences encoding platelet-derived growth factor. *Science*, 225, 636-639.

Kaplan, D.R., Chao, F.C., Stiles, C.D., Antoniades, H.N. and Scher, C.D. (1979): Platelet alpha-granules contain a growth-factor for fibroblasts. *Blood*, 53, 1043-1052.

Kelly, K., Cochran, B.H., Stiles, C.D. and Leder, P. (1983): Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell*, 35, 603-610.

Kelly, K. (1985): Growth factors short-circuited. *Nature*, 317, 390.

Kruijer, W., Cooper, J.A., Hunter, T. and Verma, I.M. (1984): Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the c-fos gene and protein. *Nature*, 312, 711-716.

Land, H., Parada, L.F. and Weinberg, R.A. (1983): Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science*, 222, 771-778.

Lee, C.K., Chan, E.W., Reilly, C.A., Jr., Pahnke, V.A., Rockus, G. and Finkel, M.P. (1979): *In vitro* properties of FBR murine osteosarcoma virus (40650). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 162, 214-220.

Levinson, A.D., Oppermann, H., Levintow, L., Varmus, H.E. and Bishop, J.M. (1978): Evidence that the transforming gene of avian sarcoma virus encodes a protein kinase associated with a phosphoprotein. *Cell*, 15, 561-572.

Levy, J.A., Hartley, J.W., Rowe, W.P. and Huebner, R.J. (1973): Studies of FBJ osteosarcoma virus in tissue culture: 1. Biologic characteristics of the "C"-type viruses. *J. Natl. Cancer Inst.*, 51, 525-539.

Lwoff, A. (1953): Lysogeny. *Bact. Rev.*, 17, 269-337.

Maniatis, R., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982): *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Martinet, Y., Bitterman, P.B., Mornex, J.-F., Grotendorst, G.R., Martin, G.R. and Crystal, R.G. (1986): Activated human monocytes express the c-sis proto-oncogene and release a mediator showing PDGF-like activity. *Nature*, 319, 158-160.

Marx, J.L. (1984): Oncogene linked to cell regulatory system. *Science*, 226, 527-528.

McAllister, R.M., Melynk, J., Finklest, J.Z., Adams, E.C. and Gardner, M.B. (1969): Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma. *Cancer*, 24, 520-526.

Mitchell, R.L., Zokas, L., Schreiber, R.D. and Verma, I.M. (1985): Rapid induction of the expression of proto-oncogene fos during human monocytic differentiation. *Cell*, 40, 209-217.

Müller, R., Slamon, D.J., Tremblay, J.M., Cline, M.J. and Verma, I.M. (1982): Differential expression of cellular oncogenes during pre- and postnatal development of the mouse. *Nature*, 299, 640-644.

Müller, R., Verma, I.M. and Adamson, E.D. (1983a): Expression of c-onc genes: c-fos transcripts accumulate to high levels during development of mouse placenta, yolk sac and amnion. *EMBO J.*, 2, 679-684.

Müller, R., Tremblay, I.M., Adamson, E.D. and Verma, I.M. (1983b): Tissue and cell type-specific expression of two human c-onc genes. *Nature*, 304, 454-456.

Müller, R. and Verma, I.M. (1984): Expression of cellular oncogenes. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Vol.112, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 73-115.

Müller, R. and Wagner, E.F. (1984): Differentiation of F 9 teratocarcinoma stem cells after transfer of c-fos proto-oncogenes. *Nature*, 311, 438-442.

Müller, R., Müller, D. and Guilbert, L. (1984a): Differential expression of c-fos in hematopoietic cells: correlation with differentiation of monomyelocytic cells in vitro. *EMBO J.*, 3, 1887-1890.

Müller, R., Bravo, R., Burckhardt, J. and Curran, T. (1984b): Induction

of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. *Nature*, 312, 716-720.

Müller, R., Curran, T., Müller, D. and Guilbert, L. (1985): Induction of c-fos during myelomonocytic differentiation and macrophage proliferation. *Nature*, 314, 546-548.

Nister, M., Heldin, C.-H., Wasteson, A. and Westermark, B. (1984): A glioma-derived analog to platelet-derived growth factor: demonstration of receptor competing activity and immunological cross-reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 926-930.

Oppermann, H., Levinson, A.D., Varmus, H.E., Levintow, L. and Bishop, J.M. (1979): Uninfected vertebrate cells contain a protein that is closely related to the product of the avian sarcoma virus transforming gene (src). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76, 1804-1808.

Pantazis, P., Pelicci, P.G., Dalla-Favera, R. and Antoniades, H.N. (1985): Synthesis and secretion of proteins resembling platelet-derived growth factor by human glioblastoma and fibrosarcoma cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 2404-2408.

Papayannopoulou, T., Nakamoto, B., Yokachi, T., Chait, A. and Kannagi, R. (1983): Human erythroleukemia cell-line (HEL) undergoes a drastic macrophage-like shift with TPA. *Blood*, 62, 832-845.

Persson, H. and Leder, P. (1984): Nuclear localization and DNA binding properties of a protein expressed by human c-myc oncogene. *Science*, 225, 718-721.

Perucho, M., Goldfarb, M., Shimizu, K., Lama, C., Fogh, J. and Wigler, M. (1981): Human-tumor-derived cell lines contain common and different transforming genes. *Cell*, 27, 467-476.

Pfeifer-Ohlsson, S., Rydnert, J., Goustin, A.S., Larsson, E., Betsholtz, C. and Ohlsson, R. (1985): Cell-type-specific pattern of myc proto oncogene expression in developing human embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 5050-5054.

Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D. and Gallo, R.C. (1980): Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 7415-7419.

Rao, C.D., Igarashi, H., Ing-Ming, C., Robbins, K.C. and Aaronson, S.A. (1986): Structure and sequence of the human c-sis/platelet-derived growth factor 2 (SIS/PDGF2) transcriptional unit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 2392-2396.

Rasheed, S., Nelsonre, W.A., Toth, E.M., Arnstein, P. and Gardner, M.B. (1974): Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer*, 33, 1027-1033.

Ratner, L., Gallo, R.C. and Wong-Staal, F. (1985): Cloning of human oncogenes. In: *Recombinant DNA Research and Virus*, ed. by Becker, Y., Martinus Nijhoff Publishing, Boston, 15-35.

- Reddy, E.P., Reynolds, R.K., Santos, E. and Barbacid, M. (1982): A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature*, 300, 149-152.
- Ross, R., Glomset, J., Kariya, B. and Harker, L. (1974): A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 1207-1210.
- Ross, R., Raines, E.W. and Bowen-Pope, D.F. (1986): The biology of platelet-derived growth factor. *Cell*, 46, 155-169.
- Rubin, H. and Temin, H.K. (1959): A radiological study of cell-virus interaction in the Rous sarcoma. *Virology*, 7, 75-91.
- Scher, C.D., Shepard, R.C., Antoniades, H.N. and Stiles, C.D. (1979): Platelet-derived growth factor and the regulation of the mammalian fibroblast cell cycle. *Biochem. Biophys. Acta*, 560, 217-241.
- Sefton, B.M., Hunter, T. and Raschke, W.C. (1981): Evidence that the Abelson virus protein functions in vivo as a protein kinase that phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 1552-1556.
- Seifert, R.A., Schwartz, S.M. and Bowen-Pope, D.F. (1984): Developmentally regulated production of platelet-derived growth factor-like molecules. *Nature*, 311, 669-671.
- Sheiness, D. and Bishop, J.M. (1979): DNA and RNA from uninfected vertebrate cells contain nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus. *J. Virol*, 31, 514-521.
- Sheiness, D.K., Hughes, S.H., Varmus, H.E., Stubblefield, E. and Bishop, J.M. (1980): The vertebrate homolog of the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus: characteristics of the DNA locus and its RNA transcript. *Virology*, 105, 415-424.
- Shen-On, G.L.C., Keath, E.J., Piccoli, S.P. and Cole, M.D. (1982): Novel myc oncogene RNA from abortive immunoglobulin gene recombination in mouse plasmacytomas. *Cell*, 31, 443-452.
- Shilo, B.Z. and Weinberg, R.A. (1981): DNA sequences homologous to vertebrate oncogenes are conserved in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 6789-6792.
- Shimokado, K., Raines, E.W., Madtes, D.K., Barrett, R.B., Benditt, E.P. and Ross, R. (1985): A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. *Cell*, 43, 277-286.
- Southern, E. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98, 503-517.
- Spector, D.H., Varmus, H.E. and Bishop, J.M. (1978): Nucleotide sequences related to the transforming gene of avian sarcoma virus are present in DNA of uninfected vertebrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 4102-4106.

Sporn, M.B. and Todaro, G.J. (1980): Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N. Engl. J. Med.*, 303, 878-880.

Stehelin, D., Varmus, H.E., Bishop, J.M. and Vogt, P.K. (1976): DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature*, 260, 170-173.

Stiles, C.D. (1983): The molecular biology of platelet-derived growth factor. *Cell*, 33, 653-655.

Tabin, C.J., Bradley, S.M., Bargmann, I., Weinberg, R.A., Papageorge, A.G., Scolnick, E.M., Dhar, R., Lowy, D.R. and Chang, E.H. (1982): Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature*, 300, 143-149.

Taparowsky, E., Suard, Y., Fasano, O., Shimizu, K., Goldfarb, M. and Wigler, M. (1982): Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. *Nature*, 300, 762-765.

Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, C., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S. and Leder, P. (1982): Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 7837-7841.

Temin, H.K. (1963): The effects of actinomycin D on growth of Rous sarcoma virus in vitro. *Virology*, 20, 577-582.

Temin, H.K. (1964a): Nature of the provirus of Rous sarcoma. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 17, 557-570.

Temin, H.K. (1964b): The participation of DNA in Rous sarcoma virus production. *Virology*, 23, 486-494.

Temin, H. and Mizutani, S. (1970): RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, 226, 1211-1213.

Theilen, G.H., Gould, D., Fowler, M. and Dungworth, D.L. (1971): C-type virus in tumor tissue of a woolly monkey (*Lagothrix* spp.) with fibrosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 47, 881-889.

Thompson, C.B., Challoner, P.B., Neiman, P.E. and Groudine, M. (1985): Levels of c-myc oncogene mRNA are invariant throughout the cell cycle. *Nature*, 314, 363-366.

Van Beveren, C., van Straaten, F., Curran, T., Müller, R. and Verma, I.M. (1983): Analysis of FBJ-MuSV provirus and c-fos (mouse) gene reveals that viral and cellular fos gene products have different carboxy termini. *Cell*, 32, 1241-1255.

Van den Ouweland, A.M.W., Roebroek, A.J.M., Schalken, J.A., Claesen, C.A.A., Bloemer, H.P.J. and Van de Ven, W.J.M. (1986): Structure and nucleotide sequence of the 5' region of the human and feline c-sis proto-oncogenes. *Nucleic Acids Research*, 14, 765-778.

Von der Helm, K. (1977): Cleavage of Rous sarcoma viral polypeptide precursor into internal structural proteins in vitro involves viral protein p15. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 911-915.

Walker, L.N., Bowen-Pope, D.F. and Reidy, M.A. (1984): Secretion of platelet-derived growth-factor(PDGF)-like activity by arterial smooth-muscle cells is induced as a response to injury. *J. Cell. Biol.*, 99, 416a.

Ward, J.M. and Young, D.M. (1976): Histogenesis and morphology of periosteal sarcomas induced by FBV virus in NIH Swiss mice. *Cancer Res.*, 36, 3985-3992.

Waterfield, M.D., Scrase, G.T., Whittle, N., Stroobant, P., Johnsson, A., Wasteson, A., Westermark, B., Heldin, C.H., Huang, J.S. and Deuel, T.F. (1983): Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28sis of simian sarcoma virus. *Nature*, 304, 35-39.

Watt, R., Nishikura, K., Sorrentino, J., ar-Rushdi, A., Croce, C.M. and Rovera, G. (1983a): The structure and nucleotide sequence of the 5' end of the human c-myc gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 6307-6311.

Watt, R., Stanton, L.W., Marcu, K.B., Gallo, R.C., Croce, C.M. and Rovera, G. (1983b): Nucleotide sequence of cloned cDNA of the human c-myc oncogene. *Nature*, 303, 725-728.

Westermark, B. and Wasteson, A. (1976): A platelet factor stimulating normal human glial cells. *Exp. Cell. Res.*, 98, 170-174.

Westin, E.H., Galló, R.C., Arya, S.K., Eva, A., Sowza, L.M., Baldua, M.A., Aaronson, S.A. and Wong-Staal, F. (1982a): Differential expression of the amv gene in human hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 2194-2198.

Westin, E.H., Wong-Staal, F., Gelmann, E.P., Dalla-Favera, R., Papas, T.S., Lautenberger, J.A., Eva, A., Reddy, E.P., Tronick, S.R., Aaronson, S.A. and Gallo, R.C. (1982b): Expression of cellular homologues of retroviral onc genes in human hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 2490-2494.

Witte, O.N., Dasgupta, A. and Baltimore, D. (1980): Abelson murine leukemia virus protein is phosphorylated in vitro to form phosphotyrosine. *Nature*, 283, 826-831.

Wolfe, L.G., Deinhardt, F., Theilen, G.H., Rabin, H., Kawakami, T. and Bustad, L.K. (1971): Induction of tumors in marmoset monkeys by simian sarcoma virus, type 1 (Lagothrix). A preliminary report. *J. Natl. Cancer Inst.*, 47, 1115-1120.

Wolfe, L.G., Smith, R.K. and Deinhardt, F. (1972): Brief communication. Simian sarcoma virus, type 1 (Lagothrix): focus assay and demonstration of non-transforming associated virus. *J. Natl. Cancer Inst.*, 48, 1905-1908.

Wong-Staal, F., Dalla-Favera, R., Gelmann, E.P., Manzari, V., Szala, S., Josephs, S.F. and Gallo, R.C. (1981): The v-sis transforming gene of simian sarcoma virus is a new onc gene of primate origin. *Nature*, 294, 273-275.

Wong-Staal, F. and Gallo, R.C. (1982): The transforming genes of

primate and other retroviruses and their human homologs. In: Advances in Viral Oncology, Vol. 1, ed. by Klein, G., Raven Press, New York, 153-168.

L E B E N S L A U F

- 13.9.1960 geboren in Kaufbeuren als Sohn des Lehrers Karl Brachmann und seiner Ehefrau Irma, geb. Veeh
- 1966-1969 Besuch der Gustav-Leutelt-Volksschule, Kaufbeuren-Neugablonz
- 1969-1970 Besuch der Konradin-Volksschule in Kaufbeuren
- 1970-1979 Besuch des Staatlichen Gymnasiums, Kaufbeuren
- Juni 1979 Abitur
- 1979-1980 Ableistung des Wehrdienstes in Pinneberg und Landsberg/Lech
- 1980-1981 Studium von Deutsch und Geschichte an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Mai 1981 Beginn des vorklinischen Abschnitts des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
- März 1983 Physikum
- Mai 1983 Beginn des klinischen Abschnitts des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
- März 1984 1. Staatsexamen
- März 1986 2. Staatsexamen
- Mai 1984- Doktorarbeit am Max von Pettenkofer Institut für medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Sep. 1986
- Mai 1987 3. Staatsexamen

